

Untersuchungen zur Struktur und Funktion von hydrophob modifizierter Lactatdehydrogenase

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Wolfgang Kapmeyer

Bochum 1976

Untersuchungen zur Struktur und Funktion von hydrophob modifizierter Lactatdehydrogenase

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Wolfgang Kapmeyer

Bochum 1976

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl Biochemie
der Abteilung Chemie der Ruhr-Universität Bochum
in der Zeit von Okt. 1973 bis Feb. 1976 unter der
Anleitung von

Herrn Professor Dr. Gerhard Pfeleiderer
angefertigt.



Herrn Professor Dr. G. Pfeleiderer spreche ich meinen
Dank aus für die Überlassung des Themas, sein reges
Interesse an meiner Arbeit und vielfältige Hinweise
und Ratschläge, die mir von großem Nutzen für die
Durchführung meiner Arbeit waren.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. H.H. Kiltz für die Ein-
führung in die Methoden der Proteinchemie und wertvolle
Ratschläge und Anregungen bei der Ausführung der Arbeit.

Den Mitarbeitern des Instituts schulde ich Dank für
viele kleine und große Hilfen.

Inhaltsverzeichnis	Seite
Teil I Die Modifizierung der Schweineherz LDH	7
1.0.0. Einleitung	7
1.1.0. Vorkommen und Eigenschaften der LDH	7
1.2.0. Struktur der LDH	9
1.3.0. Funktion essentieller Aminosäurereste	10
2.0.0. Aufgabenstellung der Dissertation	13
2.1.0. Modifizierung von Lysinen	13
2.2.0. Amidinierung	15
3.0.0. Synthesen	17
3.1.0. Modifizierungsreagenz	17
3.1.1. ϵ -Aminocaprinsäurenitril	17
3.1.2. ϵ -(N-2,4-Dinitrophenyl)aminocaprinsäurenitril	18
3.1.3. Methyl- ϵ -(N-2,4-Dinitrophenyl)aminocaproimidoester	18
3.2.0. Modellverbindungen	18
3.2.1. NPCA- ϵ -Aminocaprinsäure	18
3.2.2. ϵ -NPCA- α -Cbo-Lysin	19
3.2.3. ϵ -NPCA-Lysin	20
4.0.0. Vorversuche zur Modifizierung	21
4.1.0. Amidinierung von Insulin B	21
4.2.0. LDH in organischen Lösungsmittelgemischen	22
4.2.1. Stabilität der LDH in Gegenwart verschiedener organischer Lösungsmittel	23
4.2.2. Stabilität der LDH in DMSO-Puffer Gemischen	25

	Seite
5.0.0. Optimierung der Modifizierungsbedingungen	27
5.1.0. Puffersysteme	28
5.1.1. Boratpuffer	28
5.1.2. Triäthanolamin-HCl Puffer	29
5.2.0. Modifizierungstemperatur	30
5.3.0. Konzentration von Protein und NPCI- Reagenz	31
5.4.0. Modifizierungsdauer	31
5.5.0. Durchmischung des Reaktionsansatzes	31
6.0.0. Aufarbeitung der modifizierten NPCA-LDH	32
6.1.0. Molekularsiebchromatographie von NPCA-LDH	32
6.1.1. Molekularsiebchromatographie von aggregierender NPCA-LDH	33
6.2.0. Anreicherung von hochmodifizierter NPCA-LDH	35
6.2.1. Löslichkeit der NPCA-LDH	35
6.2.2. Anreicherung von höher modifizierter LDH durch Fällung mit Phosphationen	36
7.0.0. Modifizierung der mit NAD^+ /Sulfit geschützten LDH	38
7.1.0. Stabilität von NAD^+ im Modifizierungsansatz	38
7.2.0. Modifizierungsansatz	39
7.3.0. Diskussion	40
8.0.0. Endgültiges Modifizierungs- und Aufarbeitungsschema	41
8.1.0. Modifizierung	41
8.1.1. Erläuterungen zur Modifizierung	41
8.1.2. Modifizierungsvorschrift	41
8.2.0. Aufarbeitung	42
8.2.1. Erläuterungen zur Aufarbeitung	42
8.2.2. Aufarbeitung des Modifizierungsansatzes	43

	Seite
8.3.0. Abänderung des Aktivitätstests	45
8.4.0. Bilanz der Enzymaktivität	46
8.4.1. Modifizierung	46
8.4.2. Aufarbeitung	47
 Teil II Das Verhalten der Schweineherz NPCA-LDH	 48
 1.0.0. Einleitung	 48
1.1.0. Einfluß der Amidinierung auf das Verhalten verschiedener Enzyme	48
1.2.0. Die Hydrophobisierung von Enzymen durch Polypeptidylisierung	49
 2.0.0. Eigenschaften der hydrophob modifizierten LDH	 51
2.1.0. Einheitlichkeit der NPCA-LDH	51
2.1.1. Diskelektrophorese und isoelektrische Fokussierung	51
2.1.2. Niederspannungselektrophorese auf Acetatfolien	51
2.2.0. Stokes-Radius der NPCA-LDH	53
2.2.1. Dünnschichtgelchromatographie	53
2.2.2. Molekularsiebchromatographie	54
2.3.0. Untersuchungen zur Stabilität der NPCA-LDH	56
2.3.1. pH-Abhängigkeit der Stabilität	56
2.3.2. Abhängigkeit der Enzymstabilität von der Puffermolarität	57
2.4.0. Kinetische Untersuchungen	58
2.4.1. Bestimmung von K_m und V_{max}	58
2.4.2. Bestimmung des pH-Optimums	62
2.5.0. Strukturuntersuchungen	63
2.5.1. ORD-Spektrum der NPCA-LDH	63

	Seite
2.5.2. Thermostabilität der NPCA-LDH	64
2.5.3. Reaktive SH-Gruppen an NPCA-LDH	66
3.0.0. Tryptische Verdauung von nativer NPCA-LDH	69
3.1.0. Niederspannungselektrophorese der angedauten NPCA-LDH	72
3.2.0. SDS-Diskelektrophorese der angedauten NPCA-LDH	74
3.3.0. Thermostabilität von tryptisch angedauter NPCA-LDH	75
3.4.0. Zusammenfassung der Ergebnisse der begrenzten Proteolyse von NPCA-LDH	76
3.4.1. Diskussion der Ergebnisse	77
Teil III Die Identifizierung der Angriffspunkte des NPCI am Enzym	79
1.0.0. Einleitung	79
2.0.0. Nachweis des NPCA-Lysins im NPCA-LDH Hydrolysat	79
2.1.0. Salzsäure Hydrolyse	79
2.2.0. Proteolytische Verdauung	80
3.0.0. Bestimmung der Gesamtzahl der SH-Gruppen nach Modi- fizierung der LDH	82
4.0.0. Chymotryptisch-tryptische Verdauung der NPCA-LDH	82
4.1.0. Fingerprint der chymotryptisch-tryptisch verdauten NPCA-LDH	83
5.1.0. Übersicht über die Auftrennung der NPCA-Peptide	85
5.2.0. Molekularsiebchromatographie auf Sephadex G 25 f	87
5.2.1. Dünnschichtchromatographie der Molekularsieb- fraktionen	88
5.3.0. Gegenstromverteilung der Molekularsiebfraktionen M-2,3	90

	Seite
5.3.1. Durchführung der Gegenstromverteilung	91
5.3.2. Analytische Dünnschichtchromatographie der Gegenstromverteilungsfractionen	94
5.4.0. Präparative Dünnschichtchromatographie	96
5.5.0. Kationenaustauscherchromatographie	98
5.6.0. Anionenaustauscherchromatographie	99
5.7.0. Aufarbeitung der "großen" Peptide	100
5.7.1. Molekularsiebchromatographie auf Sephadex G 50 f	100
5.7.2. Erneute Molekularsiebchromatographie	103
5.7.3. Kationenaustauscherchromatographie	105
5.7.4. Anionenaustauscherchromatographie	105
6.0.0. Aminosäureanalysen	107
6.1.0. Aminosäureanalysen von sauberen Peptiden	107
6.2.0. Aminosäureanalysen von nicht vollständig gereinigten Peptiden	111
7.0.0. Bestimmung der sauren Aminosäuren	114
8.0.0. Endgruppenbestimmung	116
8.1.0. Aminoterminal Endgruppen	116
8.2.0. Carboxyterminale Endgruppen	118
9.0.0. Thermolysinverdauung eines Peptides	119
10.0.0. Zuordnung der Peptide	123
11.0.0. Abschätzung der Ausbeuten für die Peptide	124
11.1.0. Die modifizierte Oberfläche	129
12.0.0. Stellung der Lysine in der Quartärstruktur	131
13.0.0. Stereoaufnahmen vom Modell der LDH	135

	Seite
Teil IV Ergebnisse und Diskussion	139
1.0.0. Ergebnisse	139
1.1.0. Übersicht über die Ergebnisse	139
1.2.0. Übersicht über die gefundenen NPCA-Peptide	141
2.0.0. Diskussion	142
2.1.0. Ein Lysin am aktiven Zentrum?	142
2.2.0. Ursache des Aktivitätsverlustes bei Amidinierung	143
2.3.0. Probleme hydrophober Modifizierung	145
Teil V Material und Methoden	147
Literaturverzeichnis	172
Verwendete Abkürzungen	177
Anhang: Elutionsdiagramme	178
Anhang: Fingerprints	181

Teil I Die Modifizierung der Schweineherz LDH

1.0.0. Einleitung

1.1.0. Vorkommen und Eigenschaften der Lactatdehydrogenase

Die Lactatdehydrogenase (L-Lactat-NAD-Oxydoreduktase; EC. 1.1.1.27) spielt eine außerordentlich wichtige Rolle im tierischen und menschlichen Stoffwechsel. Sie nimmt eine zentrale Stelle im Katabolismus und Anabolismus von Kohlenhydraten ein. Bei der anäroben Glycolyse im Muskel steht sie am Ende jener Reihe von Enzymen, die Glucose zu Lactat abbauen und mit der sogenannten Substratkettenphosphorylierung ATP gewinnen. Außerdem ist die LDH an der Gluconeogenese beteiligt, das heißt, an der Neusynthese von Glucose aus Lactat in der Leber^(1,2). Die LDH katalysiert folgende Reaktion:



Kubowitz und Ott⁽³⁾ untersuchten 1943 die Stöchiometrie und Stereospezifität der LDH-Reaktion. Die Arbeitsgruppen von Racker⁽⁴⁾ sowie von Vennesland und Westheimer⁽⁵⁾ konnten zeigen, daß das Hydridion vom NADH auf das Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe des Pyruvats übertragen wird und daß der Wasserstoff der Hydroxylgruppe aus dem Medium stammt. Colowick⁽⁶⁾ zeigte 1954, daß das übertragene Hydridion am C₄ des Nicotinamidringes lokalisiert ist.

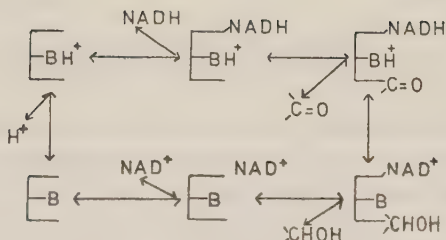


Abb. 1: Der Mechanismus der Umsetzung verläuft so, daß in geordneter Reihenfolge zuerst das Coenzym und dann das Substrat gebunden wird; nach einem sogenannten compulsory-order-Mechanismus.

Wie Pfleiderer und Jeckel zeigten⁽⁷⁾, läßt sich die LDH je nach ihrer Herkunft aus verschiedenen Geweben elektrophoretisch in fünf Komponenten zerlegen. Appella und Markert⁽⁸⁾ wiesen nach, daß die LDH als Tetramer vorliegt und in monomere Untereinheiten aufgespalten werden kann. Die Untereinheit der LDH existiert in zwei Grundtypen, der Herzmuskel oder H-Form und Skelettmuskel oder M-Form. Die beiden Homotetrameren sind die H₄- und die M₄-Form, man bezeichnet sie als Isoenzyme, das sind Enzyme, die die gleiche Umsetzung katalysieren, aber unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung und Sequenz haben. Sie unterscheiden sich in ihren kinetischen Konstanten und werden von verschiedenen Genen codiert. Die hybriden Formen sind H₃M, H₂M₂ und HM₃.

1.2.0. Die Struktur der LDH

Die Aminosäuresequenz der Lactatdehydrogenase ist für die Dornhai LDH M_4 von S. Taylor⁽⁹⁾ aufgeklärt worden. Für die Schweine LDH H_4 und M_4 sind Teile der Sequenz veröffentlicht^(10,11), der größte Teil der Sequenz von LDH H_4 und $-M_4$ vom Schwein wurde in letzter Zeit von der Arbeitsgruppe um Kiltz⁽⁶⁴⁾ am hiesigen Institut aufgeklärt. Die Sekundär- und Tertiärstruktur ist für die Dornhai LDH M_4 von Rossmann und Mitarbeitern aufgeklärt worden. Bei 2,8 Å Auflösung in der Röntgenstrukturanalyse konnte so die Lage des "back-bone" sowie die Stellung der meisten Seitenreste festgestellt werden⁽¹³⁾. Charakteristisch für die LDH ist der sogenannte aminoterminal "Arm", eine Peptidkette von 20 Aminosäuren, die aus der übrigen kompakten Struktur der Untereinheit herausragt. Bei der Tertiärstruktur der Dornhai LDH M_4 kann man zwei Bereiche unterscheiden, die durch eine angedeutete Spalte getrennt sind. Der umfangreichere aminoterminal Bereich besteht aus 6 Reihen von paralleler β -Faltblattstruktur. So ergibt sich ein blattähnlicher Bereich, er ist umgeben von Helixsträngen in denen die Peptidkette für jedes Faltblattelement zurückläuft. An diesem Bereich liegt die AMP-Bindungsstelle. Der carboxyterminale Bereich wird von zwei Einheiten aus je drei antiparallel laufenden β -Ketten und kleineren Helixbereichen gebildet. Hier liegen die NMN-Bindungsstelle sowie das aktive Zentrum des Enzyms.

Auch die Quartärstruktur der LDH wurde von Rossmann^(14,15) und Mitarbeitern aufgeklärt. Die Untereinheiten sind so angeordnet, daß eine 222 Symmetrie vorliegt. Das heißt, dreht man eine Untereinheit jeweils um 180° um die drei Raumachsen P, Q und V, so erhält man die Stellung der übrigen drei Untereinheiten. Für eine Erläuterung dieser Struktur geht man am besten von der Untereinheit V aus. Eine Rotation um die Q-Achse führt zur UE Y. Das Dimere der beiden Untereinheiten V und Y bezeichnet man als Q-Achsendimeres, es wird durch hydrophobe Wechselwirkungen in den einander angrenzenden α -Helixbereichen und durch Coulombsche Kräfte entgegengesetzt

geladener Aminosäureseitenreste zusammengehalten. Die beiden Q-Achsendimere V-Y und G-B werden durch die vier Arme der LDH zusammengehalten. Die vier Coenzymbindungsstellen liegen weit voneinander getrennt an der Außenseite der Tetramerstruktur.

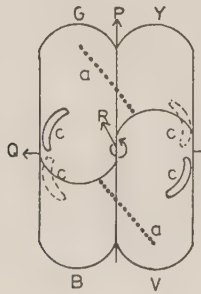


Abb. 2: Quartärstruktur der Dornhai LDH M₄

c: Coenzymbindungsstelle a: Arm

1.3.0. Funktion essentieller Aminosäurereste bei der LDH

Der Mechanismus der Katalyse der LDH wird seit Jahren intensiv untersucht. So hat man durch eine Modifizierung von Aminosäureresten im oder nahe dem aktiven Zentrum des Enzyms meist eine irreversible Hemmung erzielt. Die Untersuchungen von Pfeleiderer, Wieland, Holbrook, Kaplan und anderen zeigten, daß es pro UE LDH eine sogenannte essentielle SH-Gruppe gibt (16 bis 20). Diese läßt sich mit Maleiminiden, mit organischen Quecksilberverbindungen, mit Jod und mit Chinonen blockieren, wobei das Enzym inaktiv

wird. Wie man aus der Röntgenstrukturanalyse und der Sequenzanalyse weiß⁽²¹⁾, stammt sie aus dem Cystein 165. Sie ist nicht direkt an der Katalyse beteiligt, da sie aber in einer Entfernung von nur 10 Å zum aktiven Zentrum steht, hat die Einführung eines sperrigen Restes an dieser Stelle die Deformation der umgebenden Proteinketten und damit auch des aktiven Zentrums zur Folge. Das essentielle Histidin 195 fanden Woenckhaus und Berghäuser^(22 bis 24) durch Modifizierung mit 3-Bromoacetylpyridin und mit Bromopyruvat. Berghäuser und Falderbaum benutzten Phenylglyoxal zur Modifizierung eines essentiellen Arginins.⁽²⁵⁾ Yang und Schwert modifizierten insgesamt drei essentielle Arginine mit Butandion. Die Funktion dieser essentiellen Aminosäuren stellt man sich folgendermaßen vor: Arginin 101 bindet die Pyrophosphatgruppe des Coenzyms, Arginin 171 ist an der Bindung der Carboxylgruppe des Substrates beteiligt und Arginin 109 steht in Wechselwirkung mit der Substratbindungsregion nach einem "Herunterklappen" des Loops im ternären Komplex mit NADH und Pyruvat. Bei der Schweineherz LDH fanden Pfeleiderer und Jeckel ein an der Substratbindung beteiligtes Tyrosin^(27,28), das durch Nitrierung der LDH mit Tetranitromethan sowie durch Diazotierung mit Diazobenzolsulfonsäure markiert wurde. Eine Beteiligung von Lysinen an der Substratbindung oder an der Umsetzung kann bei der Schweineherz LDH ausgeschlossen werden, wie Pfeleiderer und Zaki^(65,66) durch die Acetylierung von LDH mit Acetylimidazol zeigten. Hierbei blieb die enzymatische Aktivität erhalten, obwohl bis zu 14 von insgesamt 24 Lysinen acetyliert wurden. In einer anderen Arbeit von Tuengler⁽⁷¹⁾ wurden 9 Lysine acetyliert, unter voller Erhaltung der enzymatischen Aktivität. In Gegenwart von NAD^+ konnten dagegen nur 6 Lysine umgesetzt werden⁽⁷¹⁾.

Für die Aufklärung des Enzymmechanismus ist die chemische Modifizierung bestimmter Aminosäureseitenketten im nativen Proteinmolekül äußerst nützlich. In der Regel wird eine irreversible Hemmung des Enzyms beobachtet, wenn man für

die Katalyse wichtige Aminosäurereste in der Art, der Ladung oder der Größe verändert. In anderen Fällen, wie bei der Nitrierung eines essentiellen Tyrosins mit Tetranitromethan⁽²⁷⁾ tritt nur ein partieller Aktivitätsverlust durch Änderung des pK-Wertes der Hydroxylgruppe des Tyrosins ein. Wichtige Erkenntnisse über den Enzymmechanismus gewinnt man durch die Untersuchung der veränderten kinetischen Daten des Enzyms.

Ein großes Problem bei der Modifizierung von Enzymen ist eine unspezifische Denaturierung durch extreme pH-Werte oder durch organisches Lösungsmittel, wenn die Reaktionsbedingungen dieses nötig machen. Eine besonders elegante Modifizierungstechnik ist die gezielte Einführung bestimmter Gruppen in das Enzym mit Hilfe eines reaktiven Coenzym oder Inhibitors. Hierbei geschieht die eigentliche Modifizierung erst im Coenzym-Enzym- oder Inhibitor-Enzym-Komplex an einer vorherbestimmten Stelle, man spricht in diesem Falle von Affinity Labeling⁽⁸¹⁾.

2.0.0. Aufgabenstellung der Dissertation

Die Dissertation gliedert sich in drei Teile.

Teil I: Modifizierung von Lactatdehydrogenase H_4 .

Die Modifizierung wurde mit dem Imidoester Methyl- ϵ -(N-2,4-Dinitrophenyl)-aminocaproimidat-HCl durchgeführt. Es wurde versucht, eine möglichst große Zahl von hydrophoben Resten einzuführen, um die Eigenschaften des Enzyms weitgehend zu ändern.

Teil II: Untersuchungen über die Struktur und Funktion der modifizierten LDH. Das Verhalten der amidinierten LDH wurde mit unmodifizierter LDH verglichen. Weiter wurde geprüft, inwieweit das modifizierte Enzym durch seine hydrophobe Außenhülle abweichende kinetische Eigenschaften hat.

Teil III: Identifizierung der Angriffspunkte des Imidoesters am Protein. Die modifizierte LDH wurde proteolytisch verdaut, die Amidinopeptide getrennt und identifiziert. Die Peptide wurden aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung und ihrer Peptidengruppen bekannten Sequenzen der LDH zugeordnet.

2.1.0. Modifizierung von Lysinen

Bei der Auswahl eines Modifizierungsreagenzes für Lysine ist die Frage zu untersuchen, welche Wirkung man mit einer Modifizierung erzielen will.

1) Man kann die Ladung erhalten und zusätzlich verschieden lange Alkylreste an der Aminogruppe einführen. z.B.: Alkylierung mit Aldehyden und Natriumborhydrid^(26,69).

2) Man kann die Ladung erhalten, aber um einige Atome verschieben. Die Basizität der Gruppe wird verändert. z.B.: Amidinierung⁽³¹⁾, Guanidinierung⁽⁷⁰⁾ und Polypeptidylisierung^(41,42).

- 3) Man kann die Ladung des Lysins abbauen, z.B. durch eine Acetylierung⁽⁶⁶⁾ oder eine Trinitrobenzolsulfonierung⁽⁷²⁾.
- 4) Man kann zusätzliche negative Ladungen an Stelle der positiven einführen, z.B. durch Umsetzung mit Dicarbonsäureanhydriden, mit der Succinylierung⁽⁷¹⁾ oder der Maleylierung⁽⁷⁴⁾.
- 5) Man kann zusätzliche positive Ladungen einführen, z.B. durch Umsetzung mit β -Dimethylamino-propionimidat·HCl.

Lysine, die man bei einem Enzym modifizieren kann, lassen sich durch ihre Lage in der Proteinstruktur unterscheiden:

I) Lysine an der Oberfläche eines nativen Enzyms.

1) Nach den Ergebnissen der Röntgenstrukturanalysen von Proteinen befindet sich die Mehrzahl der Lysinreste auf der Oberfläche eines Proteins. Ihre Funktion ist die Bindung von Wasser und Ionen zur Stabilisierung der Proteinstruktur (Hydrathülle). Eine Modifizierung dieser Lysine sollte nur einen geringen Einfluß auf die katalytische Funktion des Enzyms ausüben.

2) Andere Lysine, ebenfalls leicht zugänglich an der Oberfläche des Enzyms, können dem aktiven Zentrum zugeordnet werden. Sie müssen nicht direkt an der Katalyse beteiligt sein, binden aber Substrate bzw. Coenzyme durch Ionenwechselwirkung. Ihre Modifizierung hat eine Verringerung der Aktivität des Enzyms, meist eine Inaktivierung zur Folge.

II) Lysine, die sich nicht an der Oberfläche des nativen Enzyms befinden.

1) Hierzu zählen Lysine, die in der Quartärstruktur abgedeckt sind, obwohl sie sich an der Außenseite der Untereinheit befinden. So liegt zum Beispiel die LDH bei neutralem pH nur als Tetrameres vor und die Lysine, die an den Bindungsstellen der Untereinheiten lokalisiert sind, liegen nicht an der Oberfläche des nativen Proteins. Die Aufgabe dieser Lysine besteht wahrscheinlich in einer Bindung der Untereinheiten durch elektrostatische Kräfte.

2) Mir sind nur sehr wenige Lysine bekannt, die tief im Inneren des Proteins liegen. Im Inneren der Proteine überwiegen die unpolaren Aminosäuren, so daß man von einem hydrophoben Kern der Proteine sprechen kann. Polare Aminosäuren haben dort keine Funktion.

2.2.0. Die Amidinierung

Die Aufgabenstellung, mit der sich meine Arbeit beschäftigte, waren Untersuchungen über die Lysine an der Oberfläche der LDH. Es galt sie mit einem Modifizierungsreagenz, das spezifisch mit Lysin reagiert, umzusetzen. Cysteine und Tyrosine sollten dagegen nicht beeinflußt werden. Ein derartiges gruppenspezifisches Reagenz stellen die Imidoester dar^(29,30). Ihre Anwendung zur Modifizierung von Proteinen wurde 1962 von Hunter und Ludwig⁽³¹⁾ untersucht. Bei pH 7-10 findet eine Substitution des Methylates am Imidoester durch ein Alkylamin statt:

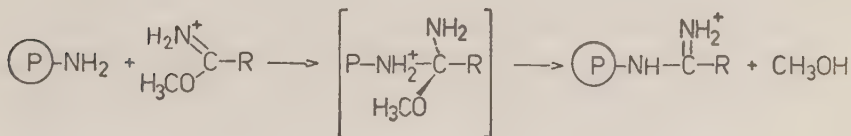


Abb. 3: Umsetzung einer Aminogruppe mit einem Imidoester unter Bildung einer Amidinogruppe.

Man spricht in diesem Falle von einer $S_{\text{Nt}2}$ Substitution, das heißt, von einer bimolekularen nucleophilen Substitution, die über ein tetraedrisches Kohlenstoffatom der Zwischenverbindung verläuft; diese stabilisiert sich unter Abspaltung von Methanol. Für eine schnelle Umsetzung der ϵ -Aminogruppe

von Lysinen ist es notwendig, bei möglichst hohem pH zu arbeiten. Denn nur die nicht protonisierte Aminogruppe ist nucleophil genug, um mit dem Imidoester zu reagieren⁽³²⁾. Auch α -Aminogruppen reagieren mit Imidoestern, aber langsamer, da sie weniger nucleophil sind.

Die Arbeitsgruppe um Plapp arbeitet seit 1969 an der Amidinierung der Leber ADH^(35 bis 39). Bei diesem Enzym konnten in Gegenwart von NAD^+ und Pyrazol als Schutzgruppe 25 von 30 Lysinen pro Untereinheit acetamidiniert werden. Die kinetischen Konstanten des so partiell modifizierten Enzyms waren denen des nativen Enzyms sehr ähnlich, die physikalischen Eigenschaften waren unverändert. Erst bei einer weiteren Amidinierung ohne Schutzgruppe kam es zu einer 20-fachen Erhöhung der Aktivität bei sehr hoher Substratkonzentration, weil dann ein essentielles Lysin modifiziert wurde. Dieser Effekt beruht auf einer Vergrößerung der Dissoziationskonstanten von NAD^+ . Gleiche Aktivitätssteigerung nach Modifizierung des essentiellen Lysins fanden sie auch für die picolinamidinierte ADH. Plapp hatte mit der Picolinamidinierung ursprünglich wohl vorgehabt, chelatisierende Gruppen für Schwermetallionen zur Röntgenstrukturanalyse einzuführen, aber nach einer Modifizierung der Leber ADH mit Picolinimidoester entstand ein sehr instabiles Enzym (Halbwertszeit 40h) welches präzipitierte und dann unlöslich war. Plapp arbeitete dann nicht mehr an einer vollständigen Picolinamidinierung der ADH weiter, weil sich diese hydrophob modifizierte ADH als sehr schwierig zu handhaben erwies (Instabilität und Unlöslichkeit). Das war ein wichtiger Hinweis für meine Arbeit, denn ich hatte mich mit den ähnlichen Problemen auseinanderzusetzen.

3.0.0. Synthesen

3.1.0. Modifizierungsreagenz

Als Modifizierungsreagenz wurde der Methyl-ε-(N-2,4-Dinitrophenyl)-aminocaproimidoester gewählt, abgekürzt: NPCI.

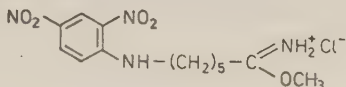


Abb. 4: Struktur des NPCI

Der Dinitroanilinchromophor ist aufgrund seiner tiefgelben Farbe sehr leicht zu identifizieren. Der hohe Extinktionskoeffizient ($\epsilon_{366} = 1,60 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in 2%iger Ameisensäure) erlaubt eine leichte Bestimmung der Einbaurrate im Protein. Der Dinitroaromat ist eine ausgesprochen hydrophobe Gruppe. Man kann daher durch den Einbau dieses Restes weitgehende Änderungen in der Hydratisierung des Proteins erwarten. Da der hydrophobe Rest über einen Spacer von 5 C-Atomen am Lysin gebunden ist, sollte eine Deformation der Proteinhülle durch direkten Kontakt des Dinitroaromaten am Protein abgeschwächt werden. Die Synthese des Modifizierungsreagenzes verläuft über die folgenden Stufen:

3.1.1. ε-Aminocapronsäurenitril

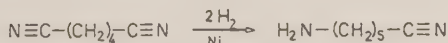


Abb. 5: Hydrierung von Adipinsäuredinitril zu ε-Aminocapronsäurenitril⁽¹⁾.

3.1.2. ϵ -(N-2,4-Dinitrophenyl)-aminocapronsäurenitril

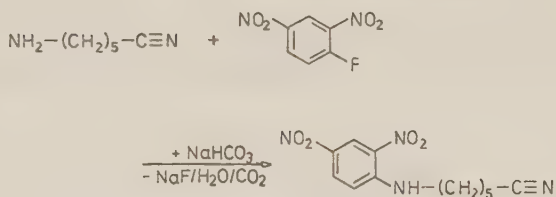


Abb. 6: Synthese von ϵ -(N-2,4-Dinitrophenyl)-aminocapronsäurenitril.

3.1.3. Methyl- ϵ -(N-2,4-Dinitrophenyl)-aminocaproimidoester

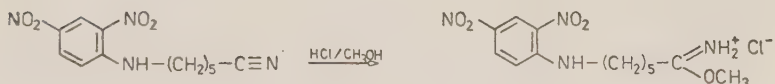


Abb. 7: Synthese von Methyl- ϵ -(N-2,4-Dinitrophenyl)-aminocaproimidoester; abgekürzt: NPCI

3.2.0. Modellverbindungen

3.2.1. NPCA- ϵ -Aminocapronsäure

Für die Einbaubestimmung am Protein wurde der molare Extinktionskoeffizient des ϵ -amidinierten Lysins benötigt. Als Modellverbindung wurde die ϵ -Aminocapronsäure mit NPCI umgesetzt.

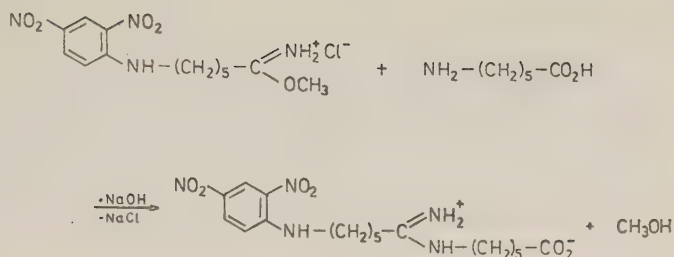


Abb. 8: Synthese der NPCA- ϵ -Aminocaprinsäure

Die entstehende NPCA- ϵ -Aminocaprinsäure stimmt bis auf die α -Aminogruppe mit dem Amidinierungsprodukt eines Lysins überein. Da die NPCA- ϵ -Aminocaprinsäure als Hydrochlorid sehr gute Kristallisationseigenschaften besaß und auf einfachem Wege analysenrein darzustellen war, wurde der molare Extinktionskoeffizient der NPCA- ϵ -Aminocaprinsäure für die Einbaubestimmungen am Protein herangezogen.

3.2.2. ϵ -NPCA- α -Cbo-Lysin

α -Aminogruppen reagieren ebenfalls mit Imidoestern und man muß ein α -aminoblockiertes Lysin einsetzen. Da die Amidinogruppe hydrolysestabil ist, konnte die Carbobenzoxygruppe nach der Modifizierung der ϵ -Aminogruppe mit HCl abgespalten werden.

Die Stabilität der Modellamidinate

Es wurde die Stabilität von ϵ -NPCA-Aminocaprinsäure und ϵ -NPCA-Lysin gegenüber 24-stündiger Hydrolyse in 6N HCl bei 108°C nachgewiesen. Die entsprechenden Verbindungen wurden dünnschichtchromatographisch auf Identität und Einheitlichkeit vor und nach der Behandlung mit 6 N HCl geprüft. Es traten keine Spaltprodukte auf. Die NPCA-Verbindungen sind also stabil gegenüber salzsaurer Hydrolyse.

4.0.0. Vorversuche zur Modifizierung

4.1.0. Die Amidinierung von Insulin B

Die Modifizierung eines Enzyms erfordert die genaue Kenntnis der Eigenschaften des Modifizierungsreagenzes, vor allem seine Löslichkeit und Stabilität in wäßrigen Lösungsmitteln. Außerdem ist es wichtig, die Reaktivität des Modifizierungsreagenzes zu wissen, um die Modifizierungsdauer abschätzen zu können. Es ist vorteilhaft, die Modifizierung zunächst an einem einfacher gebauten Peptid "durchzuspielen", um Schwierigkeiten in der Handhabung des Reagenzes kennenzulernen. So habe ich zunächst das Insulin B modifiziert, um die Einbaurate zu bestimmen.

Vorschrift:

15 mg oxidiertes Schweine-Insulin B wurden in 1,8 ml 0,1M N-Äthylmorpholinpuffer pH 9 gelöst und 0,2 ml Dimethylformamid hinzugegeben. Man gab zu Beginn der Modifizierung und

nach 10 Stunden jeweils 15 mg NPCI hinzu und stellte den pH der Reaktionsmischung mit 0,1N NaOH genau auf pH 9 ein. Damit hatte man einen 10-fachen Überschuß an Reagenz pro Aminogruppen des Insulins. Nach 25 Stunden Umsetzung bei 22°C wurde lyophilisiert und das modifizierte Protein über Sephadex G 25f in 30%iger Essigsäure entsalzt. Die Einbau-rate wurde mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten von NPCA- ϵ -Aminocaprinsäure bestimmt, es waren nur 34% der Aminogruppen modifiziert. Ausbeute: 8,6 mg modifiziertes Insulin B; 54% der eingesetzten Menge.

Ergebnisse:

Der geringe Einbau des Amidins im Insulin beruhte auf der Unlöslichkeit des Imidats in wäßrigen Lösungsmitteln. Auch die Zugabe von 10% Dimethylformamid reichte nicht aus, das meiste vom Reagenz blieb ungelöst. Man muß bedeutend mehr als 10 % organisches Lösungsmittel zusetzen, um einen genügenden Überschuß an NPCI lösen zu können. Die Umsetzungsgeschwindigkeit des NPCI ist nur gering, die Modifizierungszeiten werden dadurch sehr lang.

4.2.0. LDH in organischen Lösungsmittelgemischen

Als wäßriges System wurden zwei Puffer mit hohen pK-Werten gewählt: Boratpuffer: pK = 9,14 und Triäthanolamin: pK = 7,9. Für diese Systeme ist eine Pufferkapazität für den benötigten Bereich von pH 9,5 gewährleistet. Bekanntlich vertragen native Enzyme viele organische Lösungsmittel nur in geringen Konzentrationen. Es galt also, ein organisches Lösungsmittel zu finden, welches die Lactatdehydrogenase in hohen Konzentrationen verträgt, ohne denaturiert oder ausgefällt zu werden. Die organischen Lösungsmittel, die man zusetzt, wenn die geringe Löslichkeit des Reagenzes dieses erfordert, müssen gut mit Wasser mischbar sein. Zu den gängigen Lösungsmitteln, die für diesen Zweck vielfache Anwendung fanden, gehören Dioxan, Aceton, Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid (DMSO). Diese vier Lösungsmittel wurden in ihrer Wirkung auf die LDH untersucht.

4.2.1. Stabilität der LDH in Gegenwart verschiedener organischer Lösungsmittel

Untersucht wurde die Stabilität der LDH H_4 aus Schweineherz in 0,1M Boratpuffer pH 7,5 bei steigenden Konzentrationen von Dioxan, Aceton, Äthanol, Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid. Zum Test wurden 10 mg LDH H_4 Suspension zentrifugiert und der Niederschlag im Boratpuffer gelöst. Dazu gab man unter Eiskühlung die jeweilige Menge des organischen Lösungsmittels. Als Kriterium für die Stabilität des Enzyms diente die Enzymaktivität, diese wurde unter Standardbedingungen gemessen. Inkubiert wurde bei 4°C bzw. 22°C über 24 h. (Abbildung 11) und 12).

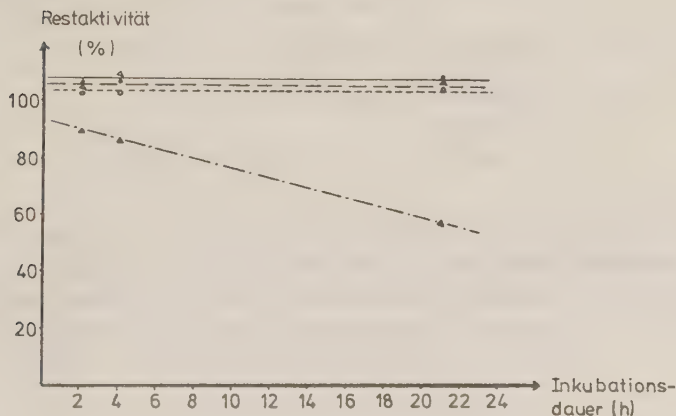


Abb. 11: Stabilitätstest der LDH

10 % organisches Lösungsmittel; 22°C.

—: Dioxan

- - : Aceton

.....: DMSO

- · - · : Dimethylformamid

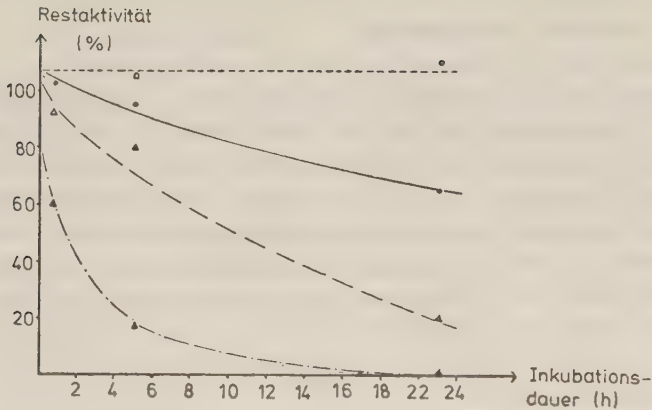


Abb. 12: Stabilitätstest der LDH

25 % organisches Lösungsmittel; 4°C

— : Dioxan

— — : Aceton

-----: DMSO

.....: Dimethylformamid

Weiter wurde die Stabilität der LDH in 0,1M Boratpuffer und 0,2M Triäthanolamin-HCl Puffer bei pH 9,5 untersucht. Es wurde 30 bis 50 % DMSO hinzugegeben und die Enzymaktivität nach verschiedenen Zeiten gemessen. Abbildung 13) und 14).

4.2.2. Stabilität der LDH in DMSO-Puffer Gemischen

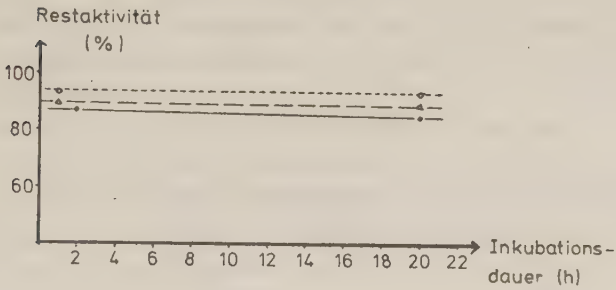


Abb. 13: Stabilitätstest der LDH

0,1M Boratpuffer pH 9,5; 4°C

-----: 30% DMSO - - - : 35% DMSO ———: 40% DMSO

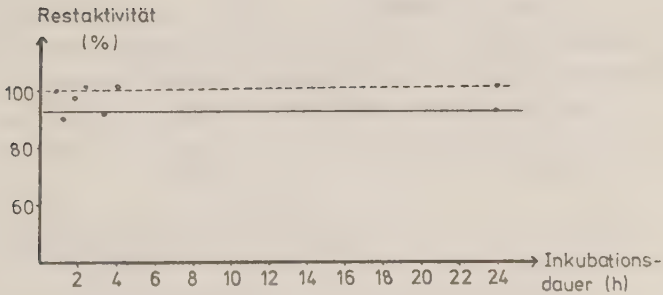


Abb. 14: Stabilitätstest der LDH

0,2M Triäthanolamin-HCl Puffer pH 9,5; 4°C

-----: 40% DMSO ———: 50% DMSO

Das einzige organische Lösungsmittel, das die LDH H_4 bis zu Konzentrationen von 40 und 50 % verträgt, ist das Dimethylsulfoxid. Das Ergebnis der Stabilitätsuntersuchungen:

Tab. 1: Halbwertszeiten und Stabilität der LDH

Halbwertszeiten bei 10 % organisches Lösungsmittel
22°C; 0,1M Boratpuffer pH 7,5

DMSO	stabil	
Dioxan	"	
Aceton	"	
Dimethylformamid	$t_{1/2}$	= 25 h

Halbwertszeiten bei 25 % organisches Lösungsmittel
4°C; 0,1M Boratpuffer pH 7,5

DMSO	stabil	
Dioxan	$t_{1/2}$	= 28 h
Aceton	$t_{1/2}$	= 12 h 30 min
Dimethylformamid	$t_{1/2}$	= 1 h 20 min

Stabilität in 30 bis 50 % DMSO
4°C; 0,1M Boratpuffer pH 9,5

DMSO 30 %, 35 % u. 40 % stabil

4°C; 0,2M Triäthanolamin-HCl Puffer pH 9,5

DMSO 40 % und 50 % stabil

Die Modifizierung der LDH mit NPCI konnte bei hohen Konzentrationen von DMSO durchgeführt werden, denn DMSO ist ein polares Lösungsmittel, das von vielen Enzymen toleriert wird. Ramler⁽⁸⁶⁾ untersuchte den Effekt von DMSO auf

Glutamat-Dehydrogenase und LDH. Bei Glutamat-Dehydrogenase fand er bis zu DMSO-Konzentrationen von 20 % keine Hemmung der Enzymaktivität. Für die LDH wies er nach, daß bis zu 30 % DMSO keine Hemmung des Enzyms bewirkt. Ich konnte nachweisen, daß die stark verdünnte LDH sogar Konzentrationen von 40 und 50 % DMSO bei 4°C über 24 Stunden ohne merklichen Aktivitätsverlust übersteht.

In den Modifizierungsansätzen fand ich dagegen bei hohen Proteinkonzentrationen von 10 mg/ml nach Zugabe von DMSO einen Aktivitätsverlust von 10 bis 15 %. Bei weiterer Inkubation nahm dagegen die Aktivität nicht weiter ab.

5.0.0. Die Optimierung der Modifizierungsbedingungen

Das Ziel der folgenden Untersuchungen war es, die Modifizierungsbedingungen so auszuarbeiten, daß ein hoher Einbau von NPCA-Resten erzielt wurde, ohne die Aktivität des Enzyms zu stark zu verringern. Alle äußeren Bedingungen, die auf die Modifizierung einen Einfluß haben, wurden variiert, wie da sind:

- 1) Puffersystem
- 2) Modifizierungstemperatur
- 3) Proteinkonzentration
- 4) Konzentration von NPCI-Reagenz
- 5) Modifizierungsdauer
- 6) Durchmischung des Reaktionsansatzes

5.1.0. Puffersysteme

5.1.1. Boratpuffer

Zunächst wurde der Boratpuffer auf seine Brauchbarkeit für die Modifizierung untersucht. Dazu wurden Kinetiken der Desaktivierung und des Einbaus für verschiedene Konzentrationen an DMSO aufgenommen. Die Einbaubestimmung wurde nach Entsalzung auf Bio-Gel P2 durchgeführt.

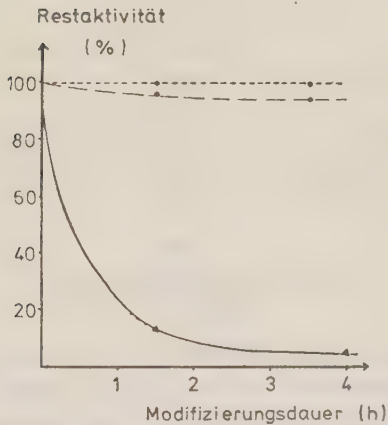


Abb. 15:

Aktivitätsverlust bei Modifizierung.

in 10 % DMSO:-----
18 % " :---
40 % " :—

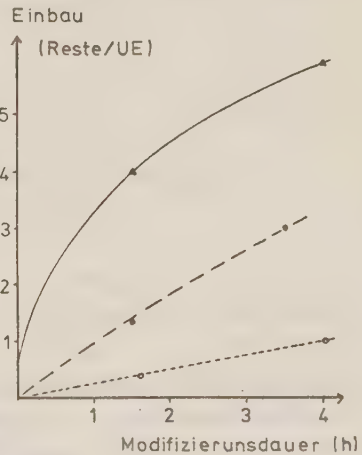


Abb. 16:

Einbau bei Modifizierung

in 10 % DMSO:-----
18 % " :---
40 % " :—

Der Boratpuffer erwies sich als Lösungsmittel für die LDH bei einer Modifizierung mit NPCI nicht brauchbar, denn es konnte bei allen Modifizierungsversuchen mit Boratpuffer und DMSO kein Einbau von mehr als 3 NPCA-Resten pro Unter-

einheit LDH ohne weitgehenden Aktivitätsverlust erreicht werden. Aus welchem Grunde eine höher modifizierte LDH im Boratpuffer nicht stabil war, sondern denaturiert wurde, wurde nicht weiter untersucht, aber anscheinend sind für die Stabilisierung der labileren modifizierten LDH nur bestimmte Pufferionen geeignet.

5.1.2. Triäthanolamin-HCl Puffer

Der 0,2M Triäthanolaminpuffer pH 9,5 erwies sich als das einzige brauchbare wäßrige Puffersystem in Gegenwart von hohen Konzentrationen von DMSO. Für die folgenden Versuche zur Optimierung wurde nur noch der Triäthanolaminpuffer verwendet. Schema der Modifizierung:

Die LDH-Suspension wurde zentrifugiert und der Niederschlag in wenig Wasser gelöst und gegen den Modifizierungspuffer dialysiert. Der Modifizierungspuffer enthielt 0,2M Triäthanolamin-HCl pH 9,5 und 0,05M Kaliumchlorid, um eine höhere Konzentration an Anionen zu erhalten. Zum Schutz der SH-Gruppen wurde $5 \cdot 10^{-5}$ M Mercaptoäthanol und 10^{-4} M EDTA hinzugesetzt. Nach der Dialyse hatte man eine Enzymlösung mit einer spezifischen Aktivität von 381 U/mg. Dazu wurde die gleiche Menge eines Puffer-DMSO Gemisches (1:2) gegeben, um nicht reines DMSO hinzufügen zu müssen (Denaturierungsgefahr). Ein kleiner Teil der LDH im Modifizierungspuffer wurde für einen parallel laufenden Stabilitätstest ohne Reagenz entnommen. Zur Modifizierung gab man dann das NPCI-Hydrochlorid, gelöst in DMSO und 0,1N Natrolauge hinzu. In diesem Puffersystem blieb der pH während der Modifizierung konstant.

Weitere Puffersysteme

Die übrigen mir bekannten Puffersysteme schieden zur Modifizierung aus. Primäre und sekundäre Amine waren nicht zu verwenden, weil sie mit Imidoestern reagieren würden.

5.2.0. Modifizierungstemperatur

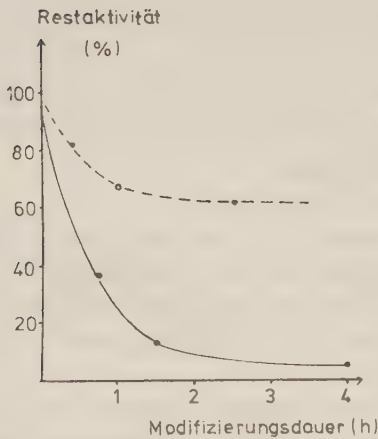


Abb. 17: Aktivitätsverlust
bei Modifizierung

— : bei 22°C
---- : bei 10°C

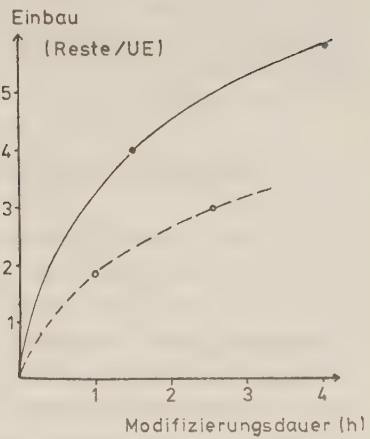


Abb. 18: Einbau bei
Modifizierung

— : bei 22°C
---- : bei 10°C

Wie die Ergebnisse zeigten, nahm der Einbau des Amidinats bei 22°C schneller zu als bei 10°C, das beruhte sowohl auf der höheren Löslichkeit des Reagenzes als auch auf der größeren Reaktionsgeschwindigkeit. Aber gleichzeitig verringerte sich bei der höheren Reaktionstemperatur sehr schnell die Aktivität des Enzyms. Die schonendsten Bedingungen für eine Modifizierung lagen bei 4°C. Die folgenden Modifizierungsversuche wurden daher in einem auf 4°C thermostatisierten Raum durchgeführt.

5.3.0. Konzentration von Protein und NPCI-Reagenz

Es wurde gefunden, daß ein 30-facher Überschuß an Reagenz pro Untereinheit Enzym am günstigsten bei einer Proteinmenge von 10 mg/ml ist. Das ist eine Reagenzkonzentration von 1,2 mg pro ml Modifizierungsansatz. Das Reagenz löste sich dann gerade noch, wenn auch zum Teil als feine Suspension. Bei höherer Konzentration an Reagenz fiel dieses aus, wobei Protein mitgefällt wurde, gleichzeitig war aber auch der Anteil an denaturiertem höher modifizierten Produkt größer, was ebenfalls ungünstig für die Ausbeute war.

5.4.0. Modifizierungsdauer

Während der Modifizierung nahm der Einbau an NPCA-Resten zunächst schnell, dann immer langsamer zu. Nach drei Tagen erreichte der Einbau einen Endwert. Die Modifizierung wurde bei den folgenden Versuchen über eine Zeitdauer von 60 bis 70 Stunden durchgeführt.

5.5.0. Durchmischung des Reaktionsansatzes

Nach einem Einbau von mehr als 6 Amidinogruppen pro UE Enzym setzte sich im Triäthanolamin-DMSO-System nach zwei Tagen die modifizierte LDH aufgrund von Aggregation ab. Eine weitere Einbausteigerung konnte daher in einer Schüttelapparatur erzielt werden.

6.0.0. Aufarbeitung der NPCA-LDH

6.1.0. Molekularsiebchromatographie von NPCA-LDH

Die Modifizierung der LDH war von einer Denaturierung eines Teiles der NPCA-LDH begleitet. Über das Molekularsieb Sephadex G 200 f wurde die native NPCA-LDH von denaturierter NPCA-LDH getrennt. Für eine wenig modifizierte LDH mit 3 NPCA-Resten pro UE traten keine Probleme auf. Es wurde während der Modifizierung eine Kinetik des Einbaus und der spezifischen Aktivität aufgenommen. Zu bestimmten Zeiten wurde jeweils ein aliquoter Teil aus dem Modifizierungsansatz entnommen, über G 200 der native Anteil abgetrennt und für den Teil der nativen NPCA-LDH nach Konzentrierung durch Druckdialyse Einbau und spezifische Aktivität bestimmt, wie es in Abb. 19 und 20 dargestellt ist.

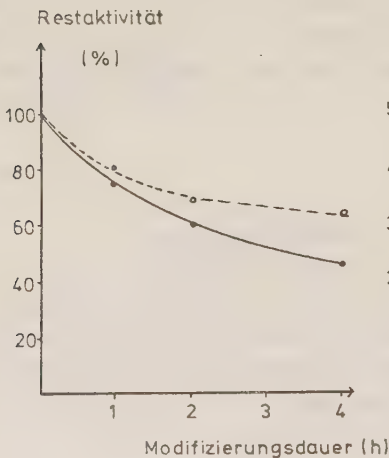


Abbildung 19:

Kinetik der Aktivität während der Modifizierung

gesamtes Enzym:—
nativer Anteil:-----

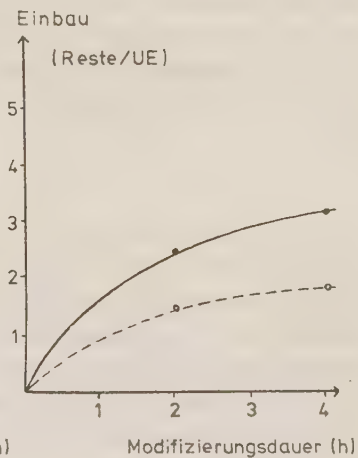


Abbildung 20:

Kinetik des Einbaus während der Modifizierung

gesamtes Enzym:—
nativer Anteil:-----

6.1.1. Molekularsiebchromatographie von aggregierender NPCA-LDH

Nach der Optimierung der Modifizierungsbedingungen wurde eine NPCA-LDH gewonnen, die große Probleme bei der molekularsiebchromatographischen Auftrennung brachte. Bei der Säulenchromatographie der modifizierten LDH auf dem Molekularsieb G 200 trat folgendes Phänomen auf. Die NPCA-LDH mit 5 Amidinogruppen pro Untereinheit der LDH zeigte folgendes Elutionsdiagramm:

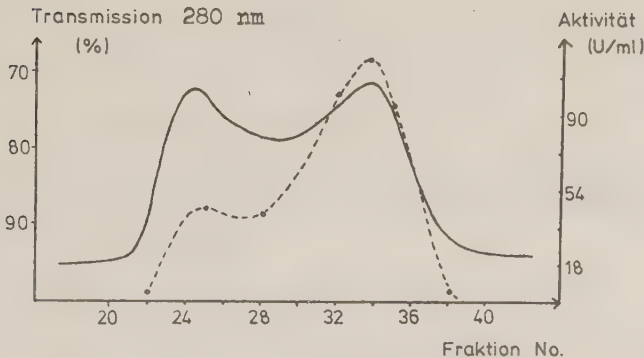


Abbildung 21: Elutionsdiagramm der Molekularsiebchromatographie

Aufarbeitung der modifizierten LDH: die Auftrennung wurde auf Sephadex G 200f durchgeführt; das Elutionsmittel war 0,02 M Pyrophosphatpuffer pH 8, 0,3 % NaCl.

—: Transmission

----: Aktivität

Zunächst war es völlig unerklärlich, weshalb im Ausschlußvolumen, wo normalerweise denaturierte LDH erscheint, Aktivität gemessen werden konnte. Die Erklärung brachte die Säulenchromatographie der gleichen modifizierten LDH in einem anderen Puffersystem:

Im Pyrophosphatpuffer löste sich die NPCA₅-LDH zwar, sie aggregierte aber und erschien im Ausschlußvolumen der Säule. Führte man die Molekularsiebchromatographie aber im des-aggregierenden Glycinpuffer durch, so erhielt man folgendes Elutionsdiagramm:

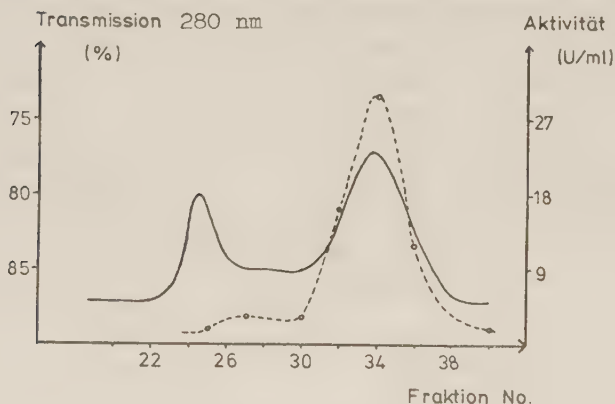


Abbildung 22: Elutionsdiagramm

Auftrennung wie in Abb. 21), aber als Elutionsmittel wurde 0,2M Glycinpuffer pH 8 mit $5 \cdot 10^{-4}$ M NAD und 10^{-4} M Sulfit benutzt.

—: Transmission

----: Aktivität

Aus den beiden Elutionsdiagrammen Abb. 21 und 22 läßt sich sehr schön ablesen, welchen Einfluß die Pufferionen auf die Aggregation der modifizierten LDH haben.

6.2.0. Löslichkeit von hochmodifizierter LDH

Mit zunehmendem Einbau von NPCA-Resten wurde die NPCA-LDH in zunehmendem Maße unlöslicher in Phosphatpuffer. Diese abnehmende Löslichkeit erlaubte eine molekularsiebchromatographische Auftrennung von hochmodifizierter LDH nur noch im desaggregierenden Glycinpuffer. Die aggregierende Wirkung verschiedener Puffersysteme auf eine modifizierte LDH mit 7 Amidinogruppen pro UE wurde im folgenden untersucht.

6.2.1. Einfluß verschiedener Pufferionen auf die hochmodifizierte LDH.

Bei höherer Pufferionenstärke

Eine modifizierte LDH mit 7 Amidinogruppen pro UE Enzym fiel bei Proteinkonzentrationen von 0,1 mg/ml bei Verdünnung in folgenden Puffern aus:

m/15 Phosphatpuffer pH 7,2; 0,1M Trispuffer pH 8
0,1M N-Äthylmorpholinpuffer pH 8,5; 0,05M Citratpuffer pH 7
0,2M Ammoniumhydrogencarbonatpuffer pH 7

Bei niedriger Pufferionenstärke

Verringerte man die Molarität an Pufferionen bei den zuvor genannten Puffersystemen auf 1 bis 10 mM, so löste sich die NPCA-LDH. Allerdings verlor das gelöste Enzym bei so geringer Ionenstärke sehr rasch an Aktivität.

Ergebnisse des Löslichkeits- und Stabilitätstests der modifizierten LDH in verschiedenen Puffersystemen:

Tab. 2:

Puffer	pH	Löslichkeit	Stabilität
0,067 M Phosphat	7,2	unlöslich	gut
0,1 M Tris	8	"	"
0,1 M N-Äthylmorph.	8,5	"	weniger gut
0,05 M Citrat	7	"	schlecht
0,2 M NH_4HCO_3	7	"	"
0,1 M Triäthanolamin	8	löslich	weniger gut
0,1 M Glycin	8	"	"
1,0 M Glycin	8	"	gut

Im Glycinpuffer hoher Molarität hat die NPCA-LDH die höchste Stabilität in Lösung. Da aber bei so hoher Salzkonzentration die Viskosität des Wassers zunimmt, macht sich das in einer geringeren Flußgeschwindigkeit bei der Molekularsiebchromatographie bemerkbar (bei einer Temperatur von 4°). Außerdem reagiert das Molekularsieb G 200f auf zu hohe Salzkonzentration mit einem Schrumpfen des Gels. Deshalb wurde die modifizierte LDH bei Aufarbeitungsschritten, die mit diesem Enzym in Lösung vorgenommen wurden, in 0,1 M Glycinpuffer durch NAD^+ ($5 \cdot 10^{-4}\text{M}$) und Natriumsulfit (10^{-4}M) stabilisiert. Auch im Phosphatpuffer ist die NPCA-LDH als Suspension über mehrere Tage stabil.

6.2.2. Anreicherung von hochmodifizierter LDH

Die Unlöslichkeit von hochmodifizierter LDH in Phosphatpuffer führte dann zu dem Verfahren, durch fraktionierte Fällung hochmodifizierte LDH anzureichern. Vor der Abtrennung von denaturierter modifizierter LDH über das Molekularsieb Sephadex G 200 wurde die native modifizierte LDH durch Fällung mit Phosphationen fraktioniert gefällt. Hierzu wurde gegen m/15 Phosphatpuffer pH 7,2 dialysiert und die höher modifizierte Form konnte abzentrifugiert werden. Abbildung 23).

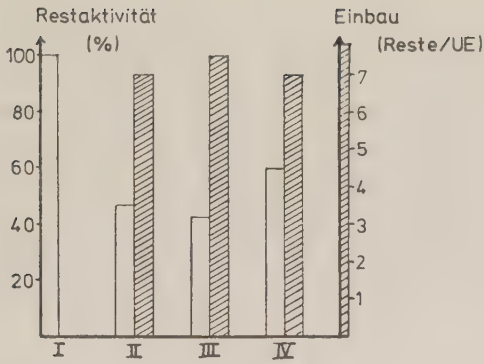


Abbildung 23: Dargestellt sind die verschiedenen Stufen der Aufarbeitung.

I: vor Modifizierung

II: nach Modifizierung

III: nach Phosphatfällung

IV: nach Molekular-
siebtrennung

□ : Restaktivität

▨ : Einbau

7.0.0. Modifizierung der mit NAD^+ /Sulfit geschützten LDH

Bevor die Optimierung der Modifizierungsbedingungen zu den höchst möglichen Einbauraten von NPCI geführt hatte, wurde die Amidinierung auch des ternären Komplexes der LDH durchgeführt. Es besteht die Frage, ob der Aktivitätsverlust bei der Modifizierung durch eine Blockierung eines essentiellen Lysins hervorgerufen wird. Engel⁽⁸⁷⁾ konnte bei der Modifizierung der LDHM_4 mit Pyridoxalphosphat und anschließender Reduktion der Schiffschen Base mit NaBH_4 einen Aktivitätsverlust feststellen. Nach mehrmaliger Modifizierung fand er eine Restaktivität von 9 % bei einem Einbau von 5,3 Molen Pyridoxalphosphat pro Mol UE LDH. Diesen Aktivitätsverlust führte er auf die Modifizierung eines essentiellen Lysins zurück, denn in Gegenwart von NAD^+ /Sulfit blieb die Aktivität erhalten und es wurden nur 2,4 Pyridoxalphosphatreste pro UE eingebaut.

7.1.0. Stabilität von NAD^+ im Modifizierungsansatz

Es tauchte die Frage auf, ob der ternäre Komplex der LDH mit NAD^+ /Sulfit sich möglicherweise in Anwesenheit von 40 % DMSO gar nicht ausbilden kann, sei es, weil NAD^+ unter den Modifizierungsbedingungen nicht stabil ist oder weil es vom Modifizierungsreagenz angegriffen wird. Deshalb wurde die Stabilität des NAD^+ unter Modifizierungsbedingungen untersucht.

Ein Modifizierungsansatz ohne LDH, bei 22°C , pH 9,7 und 40 % DMSO wurde über 6 Stunden auf die Stabilität des NAD^+ kontrolliert. Zu bestimmten Zeiten wurde ein aliquoter Teil des Ansatzes entnommen und der NAD^+ -Gehalt mit Alkoholdehydrogenase in einem enzymatischen Test gemessen. Die NAD^+ -Konzentration blieb konstant, sie war identisch mit den Werten in einem Parallelversuch ohne DMSO und stimmte etwa mit der eingewogenen Menge überein. Auch bei Zugabe des Modifizierungsreagenzes NPCI wurde keine Umsetzung des NAD^+ gefunden.

7.2.0. Modifizierungsansatz

Um mögliche "essentielle" Lysine bei der LDH H_4 durch die Amidinierung zu finden, wurde in einem Parallelversuch unter jeweils gleichen Bedingungen eine Modifizierung des ternären LDH-NAD⁺-Sulfit Komplexes und daneben eine Modifizierung des ungeschützten Apoenzyms durchgeführt.

Ansatz: Je 6 mg LDH/ml; 40 % DMSO; 30-facher Überschuß von NPCI·HCl, mit 0,1 N NaOH neutralisiert. Die Umsetzung wurde 100 h bei 4°C durchgeführt. Zu bestimmten Zeiten wurden aliquote Teile entnommen, dialysiert und jeweils Aktivität sowie Einbau von Amidinogruppen bestimmt, siehe Abb. 24 u. 25.

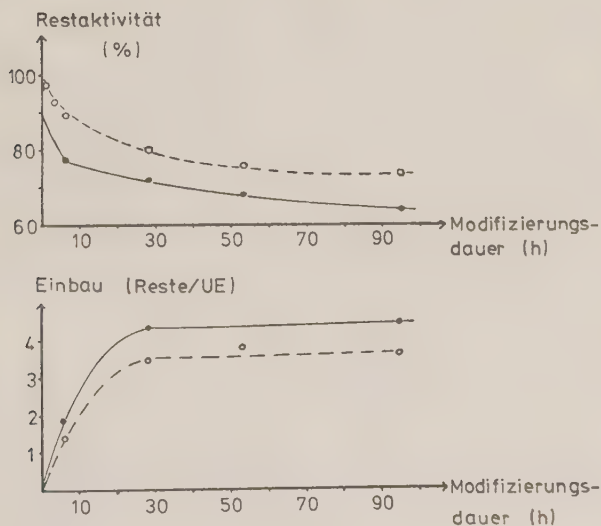


Abb. 24: Kinetik der Aktivität Abb. 25: Kinetik des Einbaus

In beiden Abbildungen: —: ohne NAD⁺; ---: mit NAD⁺

7.3.0. Diskussion

Es war kein grundlegender Unterschied in der Aktivitätsabnahme der beiden Ansätze zu beobachten. Das heißt also, daß der ternäre Komplex mit NAD^+ /Sulfit kein "essentielles" Lysin vor einer Modifizierung schützt. Die Differenz von 10 % größerer Aktivität der mit NAD^+ /Sulfit geschützten LDH kann auf dem geringeren Gesamteinbau beruhen. Der um 0,7 Amidinogruppen geringere Einbau im NAD^+ /Sulfit komplexierten Enzym läßt sich durch eine Abdeckung von nicht "essentiellen" Lysinen erklären.

Pfleiderer und Zaki^(65,66) fanden nach Acetylierung von 14 Lysinen pro Untereinheit LDH H_4 keinen Aktivitätsverlust. In einer neueren Arbeit am hiesigen Institut wurden von Tuengler⁽⁷¹⁾ 9 Lysine pro UE LDH ohne Aktivitätsverlust acetyliert und bei Anwesenheit von NAD^+ /Sulfit 6 Lysine pro UE LDH acetyliert. Die von mir ermittelte Einbaudifferenz von 0,7 NPCA-Resten zwischen ternärem Komplex und Apoenzym bei einem Gesamteinbau von 4,3 NPCA-Resten pro UE läßt sich mit Vorbehalt auf den später unter optimalen Bedingungen erzielten Einbau von 9 NPCA-Resten pro UE extrapolieren und man erhält ein bis zwei im ternären Komplex abgedeckte Lysine. (Diese Extrapolation stimmt nur bei einer statistischen Modifizierung der an der Oberfläche liegenden Lysine bei völlig gleicher Reaktivität aller).

Die gefundene Abdeckung von Lysinen im ternären Komplex, die keine essentielle Funktion haben, stimmt mit den Ergebnissen von Tuengler⁽⁷¹⁾ überein. Der bei der Amidinierung auftretende Aktivitätsverlust zeigt dagegen Ähnlichkeit mit den Ergebnissen von Engel⁽⁸⁷⁾ bei der Pyridoxalphosphatmodifizierung. Ein von mir isoliertes NPCA-Peptid (Teil III) wird dieses Problem einer Aufklärung näher bringen.

8.0.0. Endgültiges Modifizierungs- und Aufarbeitungsschema

8.1.0. Die Modifizierung

8.1.1. Erläuterungen zur Modifizierung

Wichtig ist zunächst, daß man die LDH-Suspension abzentrifugiert und in wenig Phosphatpuffer aufnimmt, damit man die Dialyse mit einer Proteinkonzentration von mindestens 20 mg/ml beginnt. Die LDH wurde zunächst ausgiebig gegen Phosphatpuffer dialysiert, da geringste Mengen von Ammoniumionen ebenfalls mit dem Imidoester reagieren würden. Zum Triäthanolamin-HCl Puffer wurde 0,025 M KCl gegeben, weil bei pH 9,5 sonst eine zu geringe Ionenstärke vorgelegen hätte. Mercaptoäthanol und EDTA wurden zum Schutz der SH-Gruppen zugegeben. Die Hauptmenge an DMSO (bis auf 32 %) wurde nicht konzentriert, sondern in 66%iger Mischung mit Modifizierungspuffer zugegeben, um eine zu hohe DMSO-Konzentration an der Eintropfstelle zu verhindern. Außerdem wurde so verhindert, daß die große Mischungswärme, die beim Zusammengeben von DMSO und H₂O auftritt, die Enzymlösung aufheizte.

Der Imidoester, der als Hydrochlorid vorliegt, wurde in DMSO gelöst und vor Zugabe mit Natronlauge neutralisiert, um eine Säuredenaturierung des Enzyms an der Eintropfstelle zu verhindern. Ich muß es als einen glücklichen Zufall bezeichnen, daß die modifizierte LDH nach einem Einbau von 7-8 NPCA-Resten pro Untereinheit ausfiel und dann als feine Suspension weiter modifiziert wurde, denn eine derartig hoch modifizierte LDH ist so labil, daß bei der benötigten langen Modifizierungsdauer von mehreren Tagen ein großer Teil denaturiert wäre.

8.1.2. Modifizierungsvorschrift

500 mg Schweineherz LDH Suspension wurden abzentrifugiert und der Niederschlag in 20 ml Wasser gelöst und zweimal gegen je

4 l m/15 Phosphatpuffer pH 7,2 dialysiert, um die Ammoniumionen zu entfernen. Dann wurde zweimal gegen je 4 l Modifizierungspuffer dialysiert.

Zusammensetzung des Modifizierungspuffers: pH 9,5

0,2 M Triäthanolamin-HCl 0,025 M KCl

$3 \cdot 10^{-4}$ M Mercaptoäthanol 10^{-4} M EDTA

Für die Modifizierung wurden eingesetzt: 409 mg Enzym, (18,2 mg/ml) mit einer spezifischen Aktivität von 400 U/mg. Dann wurden 22 ml Modifizierungspuffer/DMSO (1:2) hinzugegeben. 94 mg NPCI·HCl wurden gelöst in 6,67 ml DMSO und 3,24 ml 0,1 N NaOH und unter gutem Schütteln und Eiskühlung hinzugegeben; das entspricht einem 24-fachen Überschuß pro UE Enzym. DMSO Konzentration: 40 %. Zu Beginn der Modifizierung betrug die Proteinkonzentration 7,5 mg/ml, spezifische Aktivität: 324 U/mg Protein. Nach 60 h betrug die spezifische Aktivität: 182 U/mg (Stand.Test). Dann wurden weitere 22,5 mg Reagenz, gelöst in 0,6 ml DMSO, und 0,97 ml 0,1 N NaOH hinzugegeben. Insgesamt 30-facher Überschuß/UE. Nach 90 h war die spezifische Aktivität: 91 U/mg (Stand.Test) bzw. bei Messung in Glycinpuffer: 173 U/mg (Spez.Test)

8.2.0. Aufarbeitung

8.2.1. Erläuterungen zur Aufarbeitung

Die Abtrennung von überschüssigem Reagenz und dessen Hydrolyseprodukten war einfach, wenn man die aggregierte NPCA-LDH durch Zugabe von NAD^+ und Natriumsulfit und gleichzeitige Verdünnung des Ansatzes mit Wasser löste. Die Ausbildung des ternären Komplexes desaggregierte anscheinend wieder die modifizierte LDH bei Verdünnung in Triäthanolaminpuffer. Erst jetzt ließen sich überschüssiges Reagenz und Hydrolyseprodukte davon abzentrifugieren und bildeten einen hellgelben kompakten Niederschlag. Noch nicht gelöste modifizierte LDH

bildete dagegen einen dunkelgelben, gelartigen Niederschlag, der sich über dem Reagenzniederschlag ausbildete. Die hochmodifizierte LDH wurde von niedriger modifizierter getrennt, indem man ausgiebig gegen m/15 Phosphatpuffer dialysierte. Der Niederschlag der NPCA-LDH konnte dann abzentrifugiert und in Glycinpuffer gelöst werden.

8.2.2. Aufarbeitung des Modifizierungsansatzes

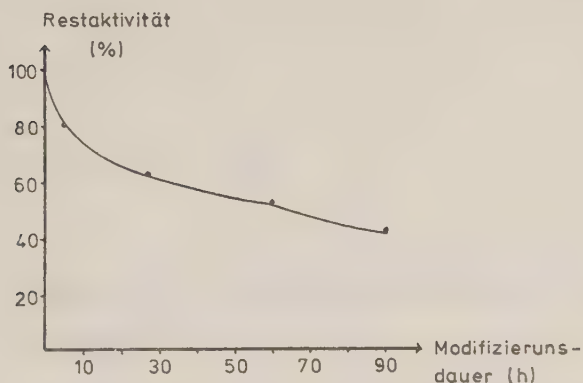


Abbildung 26: Kinetik der Aktivität während der Modifizierung

Aufarbeitungsvorschrift

Zum Reaktionsansatz wurden 40 mg NAD^+ und 20 mg Natriumsulfit, gelöst in 25 ml Wasser gegeben. Dann wurde zentrifugiert und der Niederschlag zweimal in je 12 ml 0,2 M Glycinpuffer pH 8 resuspendiert und zentrifugiert.

Aktivitätsbilanz: Überstand 58.000 U

1. Resuspension 8.200 U 2. Resuspension 965 U

Die vereinigten Überstände wurden zweimal gegen je 5 l m/15 Phosphatpuffer pH 7,2 dialysiert und der Niederschlag gelöst in 28 ml 0,2 M Glycinpuffer pH 8 mit $5 \cdot 10^{-4} \text{ M NAD}^+$, 10^{-4} M Sulfit , 10^{-4} M EDTA und 0,02 % Azid.

Aktivität nach Fällung und Lösung in Glycinpuffer: 62.000 U
Dann wurde die native modifizierte LDH über Sephadex G 200f abgetrennt. Fr. II: 12.700 U; Fr. III: 30.900 U (Abb. 27).

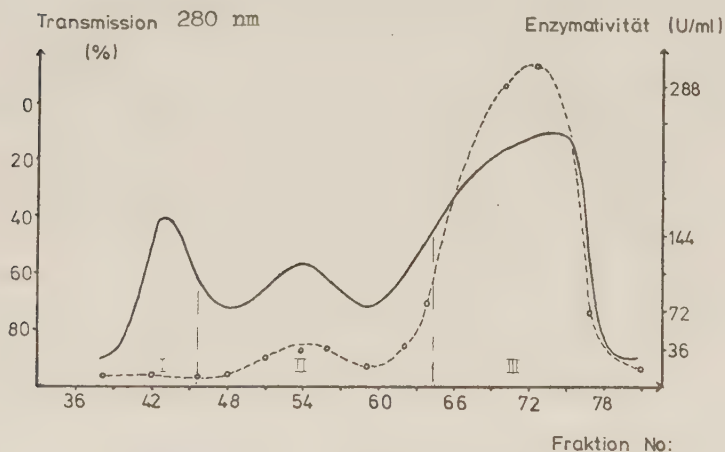


Abbildung 27: Elutionsdiagramm für die Auftrennung der modifizierten LDH mit hohem Einbau auf dem Molekularsieb. Sephadex G 200f.

—: Transmission bei 280 nm
---: Aktivitätsverlauf

Für die weiteren Untersuchungen wurde Teil III (siehe Elutionsdiagramm) von der Auftrennung der modifizierten LDH auf Sephadex G 200f herangezogen.

Ergebnisse: Einbau: 9,4 Amidinogruppen pro UE Enzym

Spezifische Aktivität: 170 U/mg oder 42 % Restaktivität.

Die Molekularsiebchromatographie der angereicherten NPCA-LDH mußte in einem Glycinpuffer mit Zusatz von NAD^+ und Sulfit durchgeführt werden, und zwar aus zwei Gründen:

- 1) Zur Stabilisierung der NPCA-LDH, weil sonst Denaturierung auftritt.
- 2) Zur Desaggregation der NPCA-LDH, die bei dem höchsten erzielten Einbau auch im Glycinpuffer zum Teil als Aggregat vorliegt, wie eine Dünnschichtgelchromatographie auf Seph.G 200 sf ergab.

Das Elutionsdiagramm zeigte drei Peaks, die denaturierte NPCA-LDH im Ausschlußvolumen der Säule, den Haupt-Peak der nativen NPCA-LDH bei 1,7-fachem Ausschlußvolumen und zwischen beiden, bei 1,24-fachem Ausschlußvolumen lag ein dritter Peak mit geringerer spezifischer Aktivität als die native tetramere NPCA-LDH. Die Art dieser modifizierten LDH wurde nicht weiter untersucht.

8.3.0. Abänderung des Aktivitätstests für die hochmodifizierte LDH

Die Optimierung der Modifizierungsbedingungen, verbunden mit einer Aufarbeitung durch Molekularsiebchromatographie und fraktionierte Fällung mit Phosphationen erbrachte einen Einbau von 7 Amidinogruppen pro Untereinheit Enzym. Eine weitere Einbausteigerung auf 9,4 Amidinogruppen pro UE konnte schließlich in einer Langzeit-Modifizierung über 90 h mit zweimaliger Reagenzzugabe erzielt werden. Im Laufe dieser abschließenden Modifizierung trat nach der zweiten Reagenzzugabe ein so abrupter Aktivitätsverlust auf, daß die Brauchbarkeit des Standardaktivitätstests untersucht wurde. Dieser liefert unter bestimmten Bedingungen falsche Ergebnisse.

Abänderung des Aktivitätstests

Das starke Aggregationsverhalten der hydrophobisierten LDH mit 8 Amidinogruppen pro Untereinheit Enzym wirkte sich auch auf den Aktivitätstest aus. Eine in Glycinpuffer stark verdünnte (auf 0,1 mg/ml) modifizierte LDH ist so weitgehend solvatisiert, daß im Testpuffer die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erzielt wird, die Umsetzung mit Substrat und NADH verhindert anscheinend die Aggregation. Verdünnt man die modifizierte LDH dagegen in einem anderen Puffer, wie z.B. Phosphatpuffer, so nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit ab. Diese verdünnte aggregierte modifizierte LDH zeigt aber wieder die volle Aktivität, wenn der Testpuffer nicht Phosphationen, sondern Glycin enthält, die Aggregation ist also reversibel.

8.4.0. Bilanz der Enzymaktivität

8.4.1. Modifizierung der NPCA-LDH mit 9,4 NPCA-Gruppen/UE.

	Enzymaktivität	Restaktivität
Modifizierung/Start	160.700 U	= 100 %
" /Ende	70.500 U	43 %

Diskussion

Der Aktivitätsverlust bei der Modifizierung beruhte zunächst wahrscheinlich auf einer Denaturierung bei Zugabe des DMSO. Es wurde aber gezeigt, daß die LDH-Aktivität bei längerer Inkubation mit dem DMSO nicht weiter abfiel. Diese Anfangsdenaturierung beruhte darauf, daß das DMSO in 66%iger Mischung mit weiterem Puffer zugegeben wurde und deshalb eine örtlich höhere DMSO-Konzentration auf die LDH einwirkte. Für die ebenfalls modifizierte denaturierte LDH kann man nichts darüber aussagen, ob sie schon denaturiert modifiziert worden ist, oder ob sie aufgrund der hohen Modifizierung denaturierte.

8.4.2. Aufarbeitung

Tabelle 3a:	Enzymmenge	Ausbeute
Modifizierung/Ende	70.500 U	= 100 %
Nach Abtrennung von überschüssigem Reagenz und Hydrolyseprodukten	67.175 U	95 %
Nach fraktionierter Fällung von NPCA-LDH	62.000 U	88 %
Nach G 200 Lauf	43.600 U	62 %

Diskussion

Bei der Abtrennung von überschüssigem Reagenz wurden nur geringe Mengen von modifizierter LDH mitgefällt. Die fraktionierte Fällung der modifizierten LDH ist mit Enzymverlust verbunden, da niedriger modifizierte LDH entfernt wurde. Eine Säulenchromatographie von labilen Enzymen ist naturgemäß immer mit einem Verlust an Aktivität verbunden, die Denaturierung tritt durch die starke Verdünnung oder durch Wechselwirkung mit dem Gel auf. Ohne Stabilisierung durch NAD^+ und Sulfit wäre die modifizierte LDH so schnell denaturiert, daß gar keine Säulenchromatographie möglich gewesen wäre.

Teil II Das Verhalten der NPCA-LDH

1.0.0. Einleitung

Amidinierungen an intakten Enzymen wurden mit gutem Erfolg von einer ganzen Reihe von Autoren durchgeführt, z.B. als Quervernetzungsreagentien^(75,76) oder zur Einführung von chelatisierenden Gruppen zur Röntgenstrukturanalyse⁽⁷⁷⁾. Eine der ersten Arbeiten über Amidinierungen von Enzymen war die von Reynolds⁽³³⁾. Er amidinierte Rinderpankreasribonuclease mit Acetimidoester. Die physikalischen Konstanten des amidinierten Enzyms wie UV-Spektrum, ORD-Spektrum und Sedimentationskonstante blieben unverändert. Die amidinierte Ribonuclease war außerdem gegenüber tryptischer Verdauung stabil. Da aber in der Ribonuclease das Lysin 41 essentiell ist, fiel nach der Modifizierung die Aktivität ab.

Von Neuberger⁽³⁴⁾ wurde eine Acetamidinierung am Lysozym durchgeführt. Es konnten nach Modifizierung keinerlei Veränderungen der physikalischen Konstanten des Enzyms beobachtet werden. Auch die Aktivität gegenüber intakten Zellen sowie gegen tetrameres N-Acetylglucosamin blieb unverändert. Dagegen beschreibt Coubrey⁽⁹³⁾ einen zunehmenden Aktivitätsverlust des Lysozyms bei einer Amidinierung mit Imidoestern zunehmender Kettenlänge.

1.1.0. Einfluß der Amidinierung auf das Verhalten verschiedener Enzyme

Wie aus verschiedenen Arbeiten^(33,34) hervorgeht, hat die Acetamidinierung nur einen geringen Einfluß auf die Löslichkeit und Stabilität von Enzymen. Nur in einem Fall ist mir eine Auswirkung auf das Aggregationsverhalten eines acetamidinierten Proteins bekannt, bei der Acetamidinierung von Lactalbumin. Dies wurde von Kronman und Andreotti⁽⁴⁰⁾ untersucht. Das α -Lactalbumin liegt oberhalb des isoelektrischen Punktes bei pH 6 als Monomeres vor. Bei pH 2 tritt

Aggregation auf. Eine Acetamidinierung sowie auch eine Butyramidinierung aller Lysine führt zu einem Protein mit unveränderter Monomerenstruktur; Sed.konst.: 2,17 S. Während aber das unmodifizierte α -Lactalbumin nach 1 h Zentrifugation bei pH 2 nur zu wenigen Prozent als Aggregat vorliegt, liegt das Acetamidino- α -Lactalbumin nach einstündiger Zentrifugation bei pH 2 zu 30 % als Aggregat vor; Sed.konst.: 9,7 S. Das Butyramidino- α -Lactalbumin tritt unter den gleichen Zentrifugationsbedingungen sogar zu 60 % als Aggregat auf. Die Einführung von hydrophoben Resten verstärkt also die Aggregation um den Faktor 10-20. Die Acetamidinierung und noch stärker die Butyramidinierung, die in gewissem Ausmaße die Oberfläche des Proteins hydrophober machen, können somit unter bestimmten Bedingungen großen Einfluß auf das Aggregationsverhalten eines Proteins haben.

1.2.0. Die Hydrophobisierung von Enzymen durch Polypeptidylisierung

Eine Hydrophobisierung eines Proteins wurde bisher in der Regel über eine andere Art der Modifizierung erzielt. Die Einführung von hydrophoben Resten an der α -Aminogruppe von Lysinen ist von mehreren Autoren beschrieben worden. Sie wandten als Modifizierungsmethode die Polypeptidylisierung an. Hierbei wird das Protein mit N-Carboxyanhydriden von Aminosäuren umgesetzt.

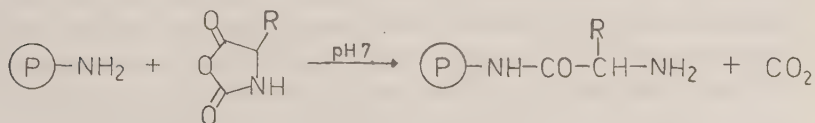


Abb. 28: Umsetzung von einer Aminogruppe mit dem N-Carboxyanhydrid einer Aminosäure.

Die entstehende α -Aminogruppe reagiert mit weiteren N-Carboxyanhydriden, so daß längere Peptidketten entstehen. Anfinen⁽⁴¹⁾ polyalanylierte Ribonuclease, indem er 80 % aller Lysine modifizierte, unter voller Erhaltung der Aktivität und Konformation des Enzyms. Entscheidend für die Auswirkung der Polypeptidylierung eines Proteins ist die Hydrophobie der Seitenkette der angeknüpften Aminosäuren. Das Polyalanin hat noch keine ausgeprägten hydrophoben Eigenschaften, im Gegensatz zum Polyvalin und Polytyrosin, die nach Anknüpfung an ein Protein dessen Löslichkeit stark verringern. Nishikawa⁽⁴²⁾ polyvalylierte die Ribonuclease, indem er 80 % aller Lysine mit durchschnittlich 3 Valinresten modifizierte. Diese modifizierte Ribonuclease besaß nur noch 70 % Restaktivität und war sehr schwer löslich. Ein Lösen dieses Proteins gelang in dem sehr polaren Puffersystem 2-[Tris(hydroxymethyl-methyl)-amin]-äthansulfonsäure. Beim Erwärmen von 0° auf 25°C aggregierte die Polyvalylribonuclease aber wieder und präzipitierte. Eine bessere Löslichkeit zögte dieses hydrophobisierte Protein nur in Gegenwart von Harnstoff, Guanidiniumchlorid und Äthylenglykol. Große Schwierigkeiten mit der Löslichkeit hatte Katchalski⁽⁴³⁾ mit polytyrosyliertem Trypsin. Nach einer Modifizierung von 57 % aller Lysine mit jeweils 2,5 Tyrosinresten konnte er nur einen Teil der Reaktionsprodukte in Lösung halten. Dieses Polytyrosyltrypsin zeigte unveränderte Enzymaktivität und gleiche Inhibierung durch Sojabohneninhibitor. Es zeigte eine leicht veränderte Rotationsdispersionskonstante, aber keine Veränderung der Sedimentationskonstante. Die Löslichkeit war allerdings sehr gering und abhängig vom pH-Wert und den Gegenionen.

Die im Rahmen dieser Dissertation dargestellte NPCA-LDH mit 8 bzw. 9,4 NPCA-Resten pro UE zeigte sehr große Ähnlichkeit in Bezug auf Löslichkeit und Stabilität mit polypeptidyltierten Enzymen^(42,43). Wie aus Teil I über die Isolierung der NPCA-LDH hervorgeht, löste sich die NPCA-LDH in keinem Puffersystem, außer im Glycinpuffer. Die NPCA-LDH war nur in Glycinpuffer in Gegenwart von NAD^+ und Sulfit stabil. In den folgenden Versuchen sollen die Eigenschaften der modifizierten LDH untersucht werden. Als erstes wurde die Einheitlichkeit der NPCA-LDH untersucht.

2.0.0. Eigenschaften der hydrophob modifizierten LDH H_4

2.1.0. Einheitlichkeit des nativen modifizierten Enzyms

2.1.1. Diskelektrophorese und isoelektrische Fokussierung

Die Diskelektrophorese wurde in 7,5%igem Polyacrylamidgel durchgeführt. Eine modifizierte LDH mit 2 Amidinogruppen pro Untereinheit sowie eine höher modifizierte mit 4,5 Amidinogruppen pro UE zeigten identische Laufstrecken mit unmodifizierter LDH. Höher modifizierte LDH konnte auf Grund der Unlöslichkeit in den verwendeten Puffersystemen nicht untersucht werden.

Die Isoelektrofokussierung in 7,5%igem Polyacrylamidgel zeigte bei Verwendung von Ampholine pH 3,5-10 für die modifizierte LDH von 4,5 Amidinogruppen pro UE das gleiche Bild wie die unmodifizierte LDH. Höher modifizierte LDH konnte auch hier auf Grund der Unlöslichkeit nicht untersucht werden.

2.1.2. Niederspannungselektrophorese auf Acetatfolien

Schon nach einem Einbau von 2 Amidinogruppen pro UE Enzym blieb die modifizierte LDH im üblichen Trispuffersystem am Auftragspunkt liegen. Höher modifizierte LDH mit 8 Amidinogruppen pro UE wanderte auch im desaggregierenden Glycinpuffer nicht im elektrischen Feld. Eine Elektrophorese war erst dann möglich, wenn man das Protein besser solvatisierte. Das gelang, indem man die Folie in einem 0,05 M Glycinpuffer einweichte, der 40 % DMSO enthielt. Zur Stabilisierung des Enzyms wurden $5 \cdot 10^{-3} \text{ M NAD}^+$ und 10^{-3} M Sulfid zugesetzt.

Die Elektrophorese von modifizierter LDH (8 Amidinogr. pro UE) neben unmodifizierter LDH ergab unter diesen Bedingungen (300 V 1 Stunde Laufzeit) folgendes Bild: Abb. 29.

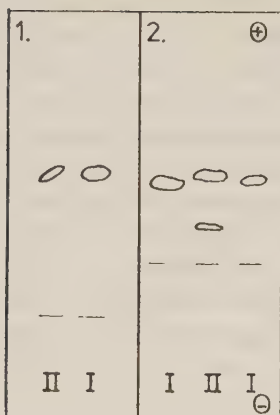


Abb. 29: Niederspannungselektrophorese von NPCA-LDH

Folie 1) LDH-spezifische Anfärbung

Folie 2) Proteinspezifische Anfärbung

Aufgetragen ist: I = NPCA-LDH

II = unmodifizierte LDH

Es ist klar zu 'ersehen, daß beide Proben identisch laufen, an der Ladung hat sich während der Modifizierung wie erwartet nichts geändert. Es trat auch keine Konformationsänderung auf.

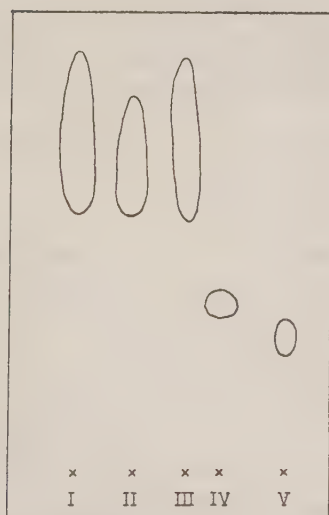
Die Untersuchungen zur Einheitlichkeit der NPCA₈-LDH (8 Amidinogruppen pro UE) zeigten, daß die gebräuchlichen Methoden, wie Diskelektrophorese und Isoelektrofokussierung für höher modifizierte LDH mit 8-9 Amidinogruppen pro UE nicht anwendbar waren, weil das Enzym ungewöhnlich schwer löslich ist. Die Niederspannungselektrophorese auf Acetatfolien war auch nur möglich, weil die Folie mit 40%iger DMSO-Glycinpuffer-Lösung vorbehandelt worden war. Ohne DMSO blieb die NPCA₈-LDH am Auftragspunkt liegen. Das DMSO schwächte die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Folie und den

hydrophoben Resten an der Oberfläche des Proteins und verhinderte eine Adsorption. Überraschend ist, daß die LDH-spezifische Anfärbung mit Tetrazoliumsalz durch die hohe DMSO-Konzentration nicht gestört wird. Das Ergebnis der Niederspannungselektrophorese waren identische Laufstrecken für NPCA₈-LDH und unmodifizierte LDH.

2.2.0. Stokes-Radius, NPCA-LDH

2.2.1. Dünnschichtgelchromatographie^(83,84)

Die Dünnschichtgelchromatographie auf Sephadex G 200 sf Platten zeigte, daß die modifizierte LDH mit 8 Amidinogruppen pro UE in 1 M Glycinpuffer pH 8 das gleiche Molekulargewicht wie unmodifizierte LDH hat. Abb. 30. Die Aggregation der NPCA-LDH machte sich durch den sehr langgezogenen Fleck bemerkbar.



I: NPCA-LDH

II: unmodifizierte LDH

III: Cytochrom C

IV: NPCA- ϵ -Aminocaprinsäure

Identifizierung auf der Platte

Proben I, III und IV durch
Eigenfarbe sichtbar.

Probe II LDH-spezifisch ange-
färbt.

Abbildung 30: Dünnschichtchromatogramm von modifizierter und nicht modifizierter LDH auf Sephadex G 200 sf.

2.2.2. Molekularsiebchromatographie (97,98)

Die Dünnschichtchromatographie zeigte zwar gleiche Laufstrecke für NPCA-LDH und unmodifizierte LDH, aber beiden kurzen Laufstrecken auf der Platte konnten keine genaueren Angaben über identische Molekülgröße gemacht werden. Um exaktere Aussagen machen zu können, wurde eine Molekularsiebchromatographie auf einer 3 cm X 180 cm Säule Sephadex G 200 f durchgeführt.

Aufgegebene Mengen: 1,5 mg NPCA_{9,4}-LDH (9,4 NPCA-Reste Einbau/UE) und 3,0 mg unmodifizierte LDH in 3 ml 0,1 M Glycinpuffer pH 8.

Elutionspuffer: 0,1 M Glycinpuffer pH 8 mit $5 \cdot 10^{-4}$ M NAD^+ , 10^{-4} M Natrium-Sulfit und 0,02 % Natriumazid.

Ergebnis: Es zeigte sich für NPCA-LDH und für unmodifizierte LDH nur ein einziger symmetrischer Peak mit einem Elutionsvolumen von 410 ml (siehe Abb.: 31). Die Konzentration von NPCA-LDH in den einzelnen Fraktionen wurde durch Messung der Extinktion bei 366 nm festgestellt. Nach Fällung der NPCA-LDH durch Zugabe von Na_2HPO_4 (2mg/ml) und Zentrifugation wurde von jeder Fraktion die Extinktion bei 280 nm und damit die Konzentration der unmodifizierten LDH bestimmt. (Tabelle 3b)

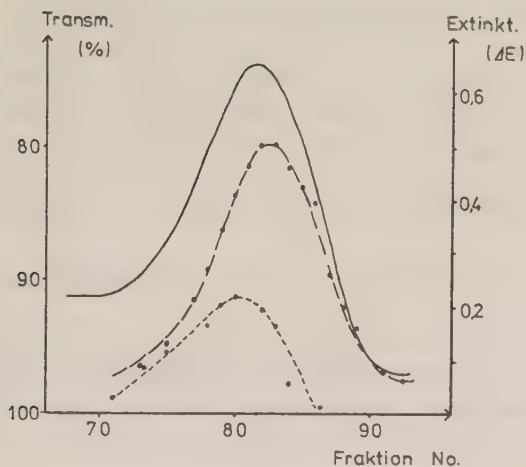


Abb. 31: Elutionsdiagramm der Molekularsiebchromatographie von NPCA-LDH und LDH auf Sephadex G 200.

—: Transmission bei 280 nm; NPCA-LDH + LDH
 - - : Extinktion bei 366 nm; NPCA-LDH
 - - - : Extinktion bei 280 nm; unmod. LDH (nach Fällung der NPCA-LDH)

Tabelle 3b:

Elutionsvolumina

Probe	Detektion	Elutionsvolumen
NPCA-LDH	bei 366 nm	410 ml
unmod. LDH	bei 280 nm (nach Fällg. d. NPCA-LDH)	405 ml
NPCA-LDH + unmod. LDH	bei 280 nm	410 ml

Die Elutionsvolumina von NPCA-LDH und unmodifizierter LDH waren innerhalb der Meßfehler identisch. Das bedeutet, daß sich im Glycinpuffer die NPCA-LDH und die unmodifizierte LDH

in ihren Stokes-Radien nicht unterscheiden. Es darf allerdings nicht vergessen werden, daß der Elutionspuffer NAD^+ und Sulfid enthielt und damit die Stokes-Radien der ternären $\text{LDH}/\text{NAD}^+/\text{Sulfid}$ Komplexe verglichen wurden.

2.3.0. Untersuchungen zur Stabilität von NPCA-LDH

2.3.1. Die Abhängigkeit der Enzym-Stabilität vom pH-Wert

Bei einer Proteinkonzentration von 1,1 mg/ml zeigte sich, daß in 0,2 M Glycinpuffer die Stabilität mit steigenden pH-Werten zunimmt, wobei für pH 4 die geringste und für pH 8 die größte Stabilität gemessen wurde. Abbildung 32.

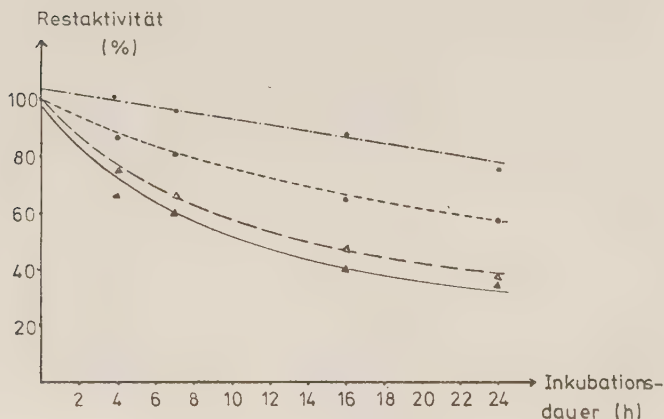


Abbildung 32: Stabilität der modifizierten LDH bei

—: pH 4; ----: pH 6; ---: pH 7; —: pH 8;

2.3.2. Abhängigkeit der Enzymstabilität von der Puffermolarität

Bei einer Proteinkonzentration von 0,25 mg/ml zeigte sich, daß bei zunehmender Puffermolarität zwischen 0,05 und 1M Glycin die Stabilität der NPCA-LDH ebenfalls zunimmt. Alle Messungen wurden bei pH 8 durchgeführt. Abbildung 33.

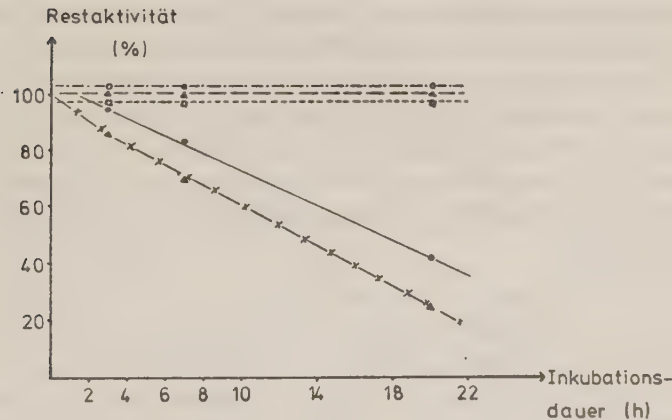


Abbildung 33: Stabilität der modifizierten LDH in Glycinpuffer

Folgende Puffermolaritäten wurden verwendet:

-----: 0,66 M - - - - : 0,33 M - - - - - : 1 M
———: 0,1 M -x-x-: 0,05 M

Abschließend wurde noch die Enzymstabilität bei verschiedenen Proteinkonzentrationen gemessen. Alle Stabilitätstests wurden in 1 M Glycinpuffer bei pH 8 durchgeführt. Die Proteinkonzentrationen lagen zwischen 0,06 und 1 mg/ml. Es zeigte sich eine geringe Zunahme der Stabilität bei kleineren Proteinkonzentrationen.

Als Ergebnis der Stabilitätsuntersuchungen wurde gefunden, daß die NPCA₈-LDH mit abnehmendem pH labiler wird. Das beruht darauf, daß im sauren Milieu mehr Carboxylgruppen protoniert werden. Dadurch erhöhen sich aber in zunehmendem Maße

die abstoßenden Kräfte der positiven Ladungen, was zur Folge hat, daß das Protein seine native Konformation verliert. Sehr interessant ist die Vergrößerung der Stabilität der NPCA₈-LDH mit zunehmender Puffermolarität. Hierbei müssen zwei Dinge getrennt betrachtet werden, die Stabilität und die Löslichkeit. Die NPCA₈-LDH ist ähnlich wie die unmodifizierte LDH auch in Phosphatpuffer und in Trispuffer stabil, aber nicht in Lösung, sondern als Suspension. Das bedeutet, daß eine bestimmte Ionenstärke nötig ist, um die native Konformation stabil zu halten.⁽¹⁰⁴⁾ Eine drastische Verringerung der Puffermolarität auf 1 bis 10 mM hat bei modifizierter wie unmodifizierter LDH eine Abnahme der Aktivität zur Folge, sie dissoziiert aber nicht völlig in die Untereinheiten wie von Jaenicke gezeigt wurde⁽⁷⁸⁾. Bei geringer Puffermolarität löst sich auch die NPCA₈-LDH Suspension, allerdings unter Denaturierung.

Bei unmodifizierter LDH wirken sich die für die Stabilität benötigten Ionen nicht auf die Löslichkeit aus. Bei der NPCA₈-LDH ist das aber anders. Nur in Gegenwart von Glycin, das als Zwitterion eine sehr große Polarität besitzt, kann die NPCA₈-LDH solvatisiert werden. Hierbei wird die Adsorption des Glycin an die Oberfläche des hydrophobisierten Proteins eine große Rolle spielen. Dadurch wird die Aggregation von Tetrameren der modifizierten LDH durch Abschwächung der hydrophoben Wechselwirkungen aufgehoben und die NPCA-LDH geht in Lösung.

2.4.0. Kinetische Untersuchungen

2.4.1. Bestimmung von K_m und V_{max}

Für eine modifizierte LDH mit 9,4 Amidinogruppen pro Untereinheit des Enzyms wurden Michaeliskonstanten und V_{max} bestimmt und wurden mit den entsprechenden Werten einer unmodifizierten LDH verglichen⁽¹⁰⁵⁾.

Für die kinetischen Messungen wurden 20 μl der NAD^+ /Sulfit stabilisierten LDH (7-10 mg/ml) über eine kurze Säule Sephadex G 25 f gelchromatographiert, um NAD^+ und Sulfit abzutrennen. Die NPCA-LDH wurde in 0,8 M Glycinpuffer pH 8 stabilisiert. Die Konzentrationen an Substraten und Co-enzymen wurden enzymatisch bestimmt. Pyruvat und NADH wurden in m/15 Phosphatpuffer pH 7,2 und Lactat in Hydrazin-Glycin-Puffer pH 9,5 (0,4 M Hydrazin, 1 M Glycin) jeweils mit einem großen Überschuß des zweiten Reaktionspartners (Coenzym bzw. Substrat) mit Lactatdehydrogenase umgesetzt. Die NAD^+ Menge im Test wurde im Hydrazin-Glycin-Puffer pH 9,5 mit Alkoholdehydrogenase durchgeführt. Vorschriften: H.U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse⁽¹⁰⁷⁾. Die Anfangsgeschwindigkeit wurde graphisch bestimmt, $1/V$ gegen $1/S$ nach Lineweaver & Burk⁽⁹⁴⁾ aufgetragen und daraus die K_m und $V_{\max}$ Werte bestimmt.

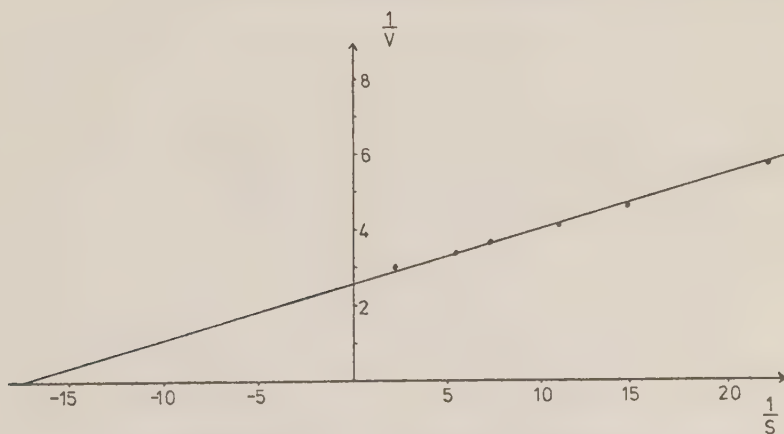


Abb. 34: Bestimmung von K_m (Pyruvat) und $V_{\max}$. Test in m/15 Phosphatpuffer pH 7,2; 0,35 mM NADH, 0,034 - 0,45 mM Pyruvat; 0,7 $\mu\text{g/ml}$ NPCA-LDH.

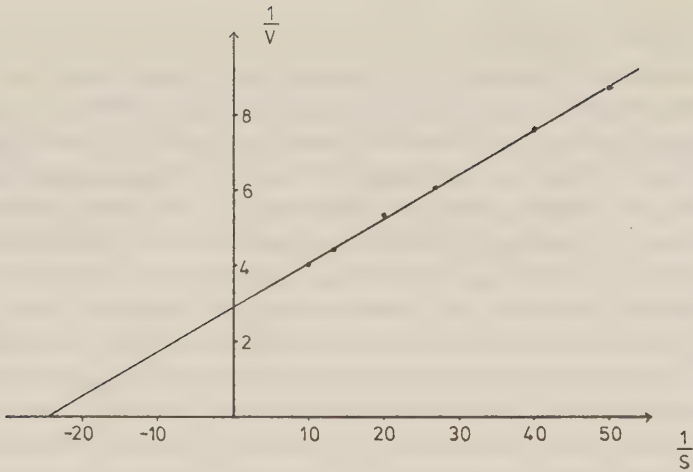


Abb. 35: Bestimmung von K_m (NADH) und V_{max} ; Test in m/15 Phosphatpuffer pH 7,2; 0,5 mM Pyruvat; 0,015 - 0,1 mM NADH; 0,7 $\mu\text{g/ml}$ NPCA-LDH.

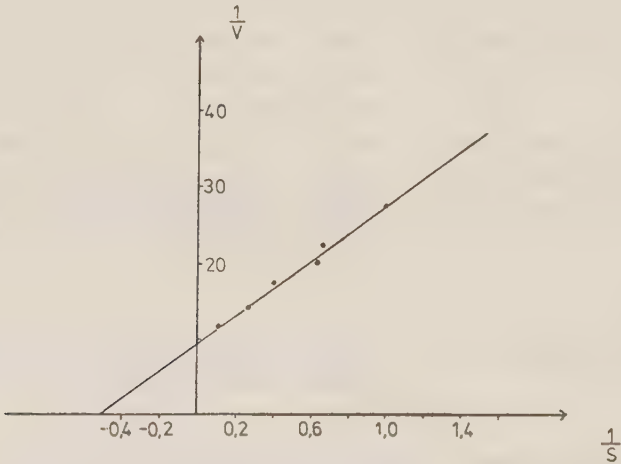


Abb. 36: Bestimmung von K_m (Lactat) und V_{max} ; Test in m/15 Glycin-NaOH Puffer pH 9,5; 0,85 mM NAD^+ ; 0,468 - 7,5 mM Lactat; 0,7 $\mu\text{g/ml}$ NPCA-LDH.

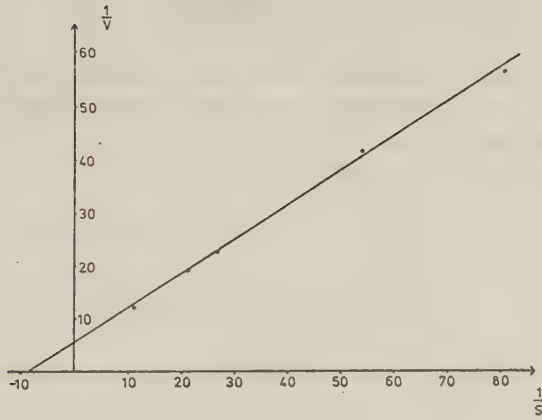


Abb. 37: Bestimmung von K_m (NAD^+) und V_{max} ; Test in m/15 Glycin-NaOH Puffer pH 9,5; 7,5 mM Lactat, 0,012 - 0,093 mM NAD^+ ; 0,7 μ g/ml NPCA-LDH.

Tabelle 4 a:

	K_m Pyruvat	V_{max}	K_m NADH	V_{max}
	μ M	U/mg	μ M	U/mg
NPCA-LDH	57	150	40	140
unmod. LDH	59	400	21	420

	K_m Lactat	V_{max}	K_m NAD^+	V_{max}
	μ M	U/mg	μ M	U/mg
NPCA-LDH	18	20	11	35
unmod. LDH	48	120	10	90

2.4.2. Bestimmung des pH-Optimums

Die Messungen für eine modifizierte LDH mit 5,5 Amidinogruppen pro UE und parallel dazu für normale LDH wurden in m/20 Phosphatpuffer + m/20 Glycin für pH-Werte von pH 5 bis pH 8 durchgeführt. (Abbildung 38)

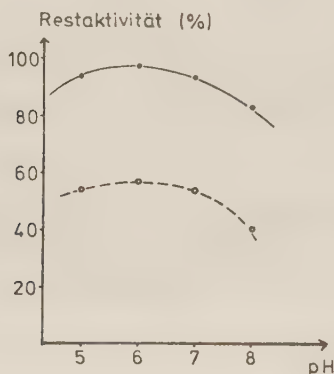


Abb. 38: pH-Optimum Bestimmung

— : unmodifizierte LDH
- - : modifizierte LDH

Die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen der NPCA-LDH zeigten eine fast unveränderte Michaeliskonstante. Die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit $V_{\max}$ war dagegen im Vergleich mit unmodifizierter LDH auf die Hälfte zurückgegangen. Somit wird durch die eingeführten Reste die Geschwindigkeit der enzymatischen Umsetzung beeinträchtigt. Eine Aggregation im Testansatz kann man als Ursache ausscheiden, denn die getestete NPCA-LDH wurde in Glycinpuffer verdünnt und ich konnte nachweisen, daß bei der großen Verdünnung im Testansatz in Gegenwart von NADH und Pyruvat keine Aggregation auftritt, denn der Test im desaggregierenden Glycinpuffer

brachte die gleichen Anfangsgeschwindigkeiten. Deswegen muß die verringerte $V_{\max}$ auf einer geringfügigen Deformation des Proteins, möglicherweise in der Nähe des aktiven Zentrums beruhen.

2.5.0. Strukturuntersuchungen

2.5.1. Das ORD-Spektrum der NPCA₇-LDH

Die geringere spezifische Aktivität des modifizierten Enzyms kann auf Konformationsänderungen beruhen, die durch die NPCA-Reste an der Oberfläche der NPCA-LDH hervorgerufen werden. Eine Methode zur Erkennung von Konformationsänderungen ist die Aufnahme von ORD-Spektren. Die α -Helix hat aufgrund ihrer Asymetrie eine besonders ausgeprägte optische Rotationsdispersion. Verändert sich bei Konformationsänderungen der Gehalt an α -Helix, dann ändert sich auch das ORD-Spektrum, wie es Jeckel⁽⁹⁴⁾ an Hand der Umsetzung von para-Chlor-mercuri-benzoat mit der LDH zeigte.

Für die modifizierte LDH mit 7 Amidinogruppen pro UE wurde die optische Rotationsdispersion aufgenommen und auf Abweichungen zum Spektrum der ORD normaler LDH untersucht. Beide Proben wurden in 0,1 M Glycinpuffer pH 9 aufgenommen. Es konnten keine Abweichungen festgestellt werden. Aus der mittleren effektiven Restdrehung bei 230 nm wurde nach Simmons und Blout⁽⁷⁹⁾ der Helixgehalt bestimmt:

$$\% \text{ Helix} = \frac{(\text{m})_{232} - 1800}{10900} \cdot 100$$

Für die unmodifizierte LDH wurde ein Helixgehalt von 31 %, für die modifizierte LDH wurden 34 % und bei einer zweiten Messung 28 % Helixgehalt gefunden. Es steht also fest, daß durch die Modifizierung keine größeren Konformationsänderungen stattfinden. Damit kann man allerdings geringfügige

Konformationsänderungen, die sich im ORD-Spektrum nicht bemerkbar machen, aber dennoch die Umgebung des aktiven Zentrums verändern können, nicht ausschließen.

2.5.2. Thermostabilität von NPCA-LDH

Die Stabilität eines Enzyms gegenüber einer Hitzebehandlung wird herangezogen, wenn man verschiedene "Spezies" eines modifizierten Enzyms untereinander oder mit dem unmodifizierten Enzym vergleichen will. Schon kleinere Veränderungen an der Oberfläche eines Enzyms können sich auf die Stabilität der Proteinstruktur auswirken. Durch die Modifizierung kann also das Protein viel labiler gegenüber thermischer Denaturierung werden. Da mit der thermischen Denaturierung die Enzymaktivität abnimmt, ist die Enzymaktivität die einfachste Meßgröße zur Bestimmung des nativen Anteils bei thermischer Denaturierung.

Vorschrift:

Die NPCA₉-LDH (9,4 Amidinogruppen pro Untereinheit) wurde bei 55°C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurde die Aktivität bestimmt. Unter identischen Bedingungen wurde auch der Aktivitätsverlust einer unmodifizierten LDH gemessen.

Ansatz: Je 0,5 ml Inkubationsansatz mit 7,28 mg/ml Protein für die amidinierte LDH und 7,1 mg/ml Protein für die native LDH, gelöst in 0,2 M Glycin-NaOH-Puffer pH 8. Die Kinetik des Aktivitätsverlustes ist in Abb. 39 und Abb. 40 dargestellt.

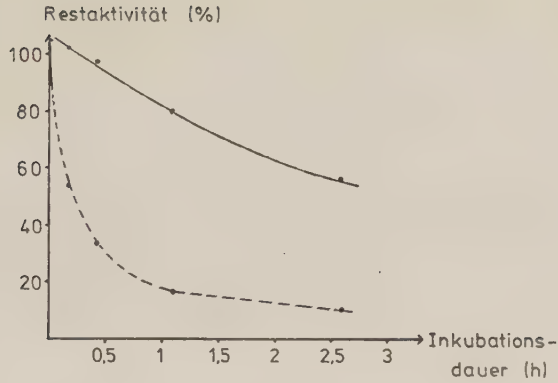


Abbildung 39: Aktivitätsverlust bei thermischer Denaturierung.

---:NPCA-LDH

—:unmod. LDH

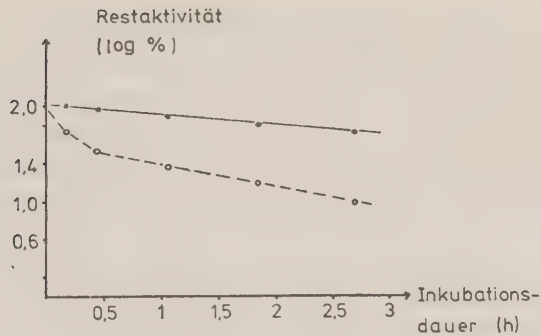


Abbildung 40: Aktivitätsverlust bei thermischer Denaturierung in halblogarithmischer Auftragung

---:NPCA-LDH

—:unmod. LDH

Halbwertszeiten für den Verlust der katalytischen Aktivität:

NPCA-LDH, anfangs	10-20 min
" , nach 30 min	75 min
unmodifizierte LDH	160 min

Die Kinetik der thermischen Desaktivierung zeigte in der halblogarithmischen Auftragung am deutlichsten die gravierenden Stabilitätsunterschiede zwischen unmodifizierter und modifizierter Lactatdehydrogenase. Die Halbwertszeit von der Hauptmenge der NPCA-LDH, ist um den Faktor 10 geringer als bei der unmodifizierten LDH. Das beruht auf der Einführung der hydrophoben Reste an der Oberfläche. Während bei der LDH die Lysine mit ihrer Hydrathülle das Protein stabilisieren, ist das nach der Modifizierung nicht mehr möglich.

2.5.3. Bestimmung der reaktiven SH-Gruppen der NPCA-LDH

In der Schweineherz LDH sind die essentiellen SH-Gruppen sehr reaktiv, sie setzen sich vollständig mit DTNB um, bevor die anderen SH-Gruppen reagieren. Der Modifizierungsgrad läßt sich sehr einfach photometrisch bestimmen, weil beim Entstehen eines gemischten Disulfides aus der Thiolgruppe des Enzyms und 2-Nitro-5-thiol-benzoesäure ein 2-Nitro-5-thioben-zoesäurerest freigesetzt wird, dessen Absorption verfolgt wird. In der unmodifizierten LDH H_4 nimmt proportional zur Aktivitätsabnahme der Einbau zu und man findet für völlige Desaktivierung eine Freisetzung von 1,3 Molen Thiophenolat pro Mol Untereinheit LDH. Für die modifizierte LDH mußte der Test aus Löslichkeitsgründen in Glycinpuffer durchgeführt werden. Damit traten aber Probleme mit der Löslichkeit des DTNB's auf.

Test: Die NPCA_{9,4}-LDH bzw. unmodifizierte LDH wurden mit jeweils der gleichen Menge DTNB versetzt und die Extinktion sowie die Enzymaktivität über mehrere Stunden verfolgt.

Es zeigte sich, daß die Reaktion von DTNB mit der unmodifizierten LDH im 0,2 M Glycin-NaOH Puffer bei pH 8 innerhalb von wenigen Minuten erfolgte, wobei gleichzeitig die Enzymaktivität abfiel. Die Umsetzung erfolgte so schnell, daß nur wenige brauchbare Meßwerte ermittelt werden konnten. Bei 50 % Restaktivität war die Reaktion beendet, weil nur eine geringe Menge DTNB zugegeben werden konnte. Für die NPCA-LDH konnten dagegen Einbau und Aktivitätsverlust über längere Zeit gut verfolgt werden. Die Abb. 41) zeigt die Aktivitätsabnahme in halblogarithmischer Darstellung.

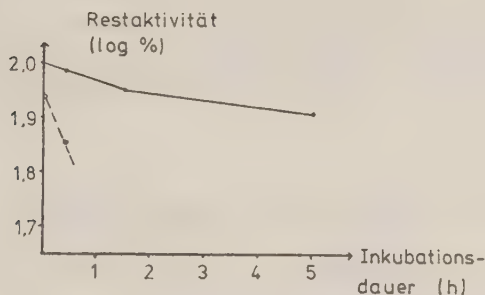


Abb. 41: Kinetik der Aktivitätsabnahme

—: NPCA_{9,4}-LDH

---: unmod. LDH

Es konnte nur ein geringer Überschuß an DTNB hinzugegeben werden, weil sonst die modifizierte LDH ausgefällt worden wäre. Deswegen war die Umsetzung nicht vollständig.

Die Zahl der reaktiven Cystein-Reste erhält man, wenn man die Restaktivität des Enzyms gegen die Mole umgesetzter SH-Gruppen pro UE Enzym aufträgt, Abb. 42)

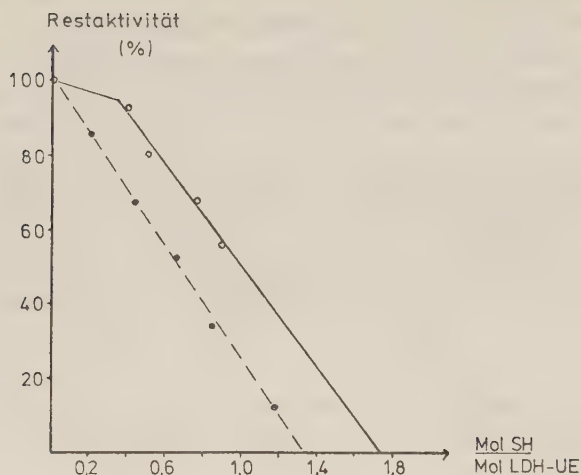


Abb. 4 : Auftragung Restaktivität gegen $\frac{\text{Mol SH}}{\text{Mol LDH}}$
 ———: NPCA-LDH ----: unmod. LDH

Den biphasischen Verlauf würde ich dadurch erklären, daß zunächst 0,3 SH-Gruppen pro UE NPCA-LDH reagieren, ohne daß die Aktivität merklich abnimmt. Das heißt, es reagiert zunächst partiell denaturierte LDH. Nimmt man eine reaktive SH-Gruppe pro UE NPCA-LDH an, so bedeutet das, daß etwa 30 % der eingesetzten NPCA-LDH denaturiert waren. Das stimmt recht gut mit einer Aktivität von 112 Units/mg oder 67 % Restaktivität der eingesetzten LDH überein, denn die NPCA-LDH war einige Tage unstabilisiert aufbewahrt worden. Stabilisierte NPCA-LDH hat dagegen eine Enzymaktivität von 170 Units/mg. Das bedeutet aber andererseits, daß die stabilisierte NPCA-LDH von 170 Units/mg keinen größeren partiell denaturierten Anteil enthält und daß sie keine frei liegenden sofort modifizierbaren SH-Gruppen besitzt. Zieht man die 0,3 SH-Gruppen in der Abb. 42) von dem für 0 % Restaktivität extra-

polierten Wert ab, so findet man 1,5 reaktive SH-Gruppen pro UE NPCA-LDH. Das ist ein Wert, der sich nicht signifikant von den entsprechenden Ergebnissen mit unmodifizierter LDH unterscheidet. Der einzige gravierende Unterschied ist die Geschwindigkeit der Umsetzung mit dem DTNB. Für die Umsetzung lassen sich ungefähre Halbwertszeiten aus der Anfangssteigerung der Aktivitätskinetik angeben:

$$\begin{array}{llll} t_{1/2} & \text{LDH H}_4 & = & 15 \text{ min} \\ t_{1/2} & \text{NPCA-LDH H}_4 & = & 300 \text{ min} \end{array}$$

Die modifizierte LDH reagiert also in dem verwendeten Puffersystem um den Faktor 20 langsamer mit DTNB als die unmodifizierte LDH. Das kann sterische Gründe haben. Die SH-Gruppe kann beispielsweise durch die eingeführten sperrigen Reste an der Oberfläche vor einer schnellen Umsetzung geschützt sein.

3.0.0. Tryptische Verdauung von amidinierter nativer LDH H₄

Eine Proteolyse von nativer GAPDH wurde von Racker⁽⁵³⁾ durchgeführt. Platt und Files⁽⁵⁴⁾ inaktivierten eine Bindungsstelle am lac-Repressor durch Proteolyse. Feinstein und Gerther⁽⁵⁵⁾ führten einen begrenzten Abbau von Chicken-Ovoinhibitor durch. In den meisten Fällen hatte man jedoch nur geringen Einfluß auf die Steuerung der Proteolyse, und das Protein verlor seine biologische Aktivität. Dagegen konnte man den Abbau auf wenige Peptidbindungen beschränken, wenn man das Enzym schützte bzw. stabilisierte, z.B. in Form des ternären Komplexes. Anfinzen⁽⁵⁶⁾ beobachtete bei der

Staphylococcal-Nuclease nach Zugabe von Desoxythymidin-3',5'-diphosphat und Calciumionen eine erhöhte Restaktivität und eine Spaltung in nur drei Peptide. Auch der Angriff von Subtilisin auf Ribonuclease wird durch 2'-Cytidylsäure stark verringert⁽⁵⁷⁾. Jeckel untersuchte die tryptische Verdauung von Schweineherz Lactatdehydrogenase⁽⁵²⁾ und stellte fest, daß in Gegenwart von NAD^+ und Sulfit 7 Peptidbindungen pro Untereinheit gespalten wurden und die Aktivität zu 90 % erhalten blieb.

Die Blockierung von einer Reihe von Lysinen sollte die Zahl der noch möglichen tryptischen Peptide in noch größerem Ausmaße verringern. So ist z.B. die Ribonuclease nach Acetamidinierung stabil gegenüber tryptischem Angriff⁽³³⁾. Da ich 60 % der außen liegenden Lysine modifiziert hatte und die übrigen zum Teil auch durch das Reagenz abgedeckt sind, war es naheliegend, die Stabilität des amidinierten Enzyms gegenüber tryptischer Verdauung zu untersuchen.

Vorschrift zur Proteolyse:

Die amidinierte LDH mit 9,4 Amidinogruppen pro UE Enzym und mit einer spezifischen Aktivität von 170 U/mg wurde über eine Sephadex G 25 sf Säule entsalzen und bei einer Proteinkonzentration von 8 mg/ml mit hochgereinigtem Trypsin im Verhältnis 1:25 verdaut. Die Verdauung wurde in 0,2 M Glycin/NaOH-Puffer pH 8 bei 23°C durchgeführt, weil die amidinierte LDH unter diesen Bedingungen die größte Stabilität hat. CaCl_2 konnte nur in einer Konzentration von 0,1 mM zur Stabilisierung des Trypsins zugegeben werden, weil sonst die modifizierte LDH präzipitierte. Das Trypsin wurde zu den Zeiten $t = 0$ und $t = 4$ h zugegeben, jeweils 1:50. Zum Vergleich wurde eine unmodifizierte LDH unter den gleichen Bedingungen verdaut. Von beiden Proben wurde eine Kinetik des Aktivitätsverlustes aufgenommen. Außerdem wurde von beiden Proben in regelmäßigen Abständen ein aliquoter Teil entnommen, eine TCA-Fällung durchgeführt und mit Biuret das fällbare Protein bestimmt. Im Überstand der Fällung wurde auch die Absorption bei 365 nm und damit die Menge von abgespaltenen, die Amidinogruppe tragenden kurzen Peptiden bestimmt.

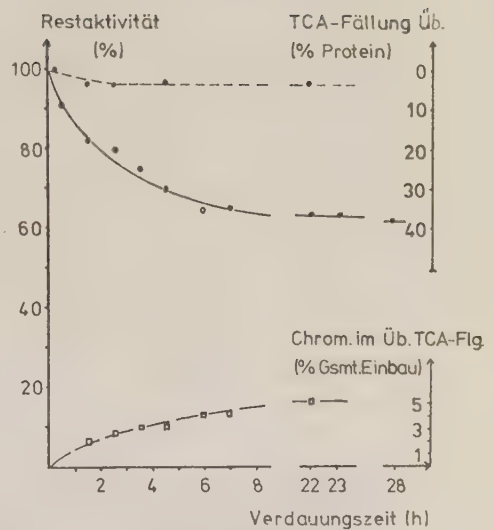
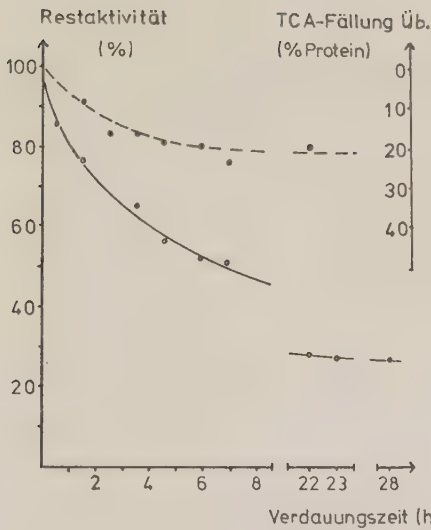


Abb. 43: Kinetik der Verdauung
unmodifizierte LDH

Abb. 44: Kinetik der Verdauung
NPCA-LDH

Kinetik des Aktivitätsverlustes: ———
des mit TCA nicht fällbaren
abgespaltenen Proteins: - - - - -
und des mit TCA nicht fällba-
ren, amidinierten Proteins: — — —

Tabelle 4b: Kinetik der tryptischen Verdauung

gemessen nach		
23ständiger Verdauung	normale LDH	NPCA-LDH
Restaktivität	27 %	63 % (korr.)
Restprotein (TCA-Flg.)	80 %	96 %
freigesetzte Menge		
Amidinogr.	-	5 %

Die korrigierten Restaktivitätswerte für die tryptische Verdauung der amidinierten LDH wurden erhalten, indem man den Aktivitätsverlust einer Vergl. NPCA-LDH ohne Trypsin abzog.

Zur Untersuchung des angedauten Proteins wurde eine schonende Verdauung der NPCA-LDH bei 4°C durchgeführt. Die amidinierte LDH mit 9,4 Amidinogruppen pro UE wurde über Sephadex G 25 sf entsalzen (spezifische Aktivität von 91 U/mg, da nicht frisch entsalzen). Die Verdauung wurde mit hochgereinigtem Trypsin im Verhältnis 1:5 ! 26 h lang bei 4°C durchgeführt. Das Trypsin wurde zu den Zeiten $t = 0, 1 \text{ h}, 4 \text{ h}$ und 20 h jeweils 1:20 zugegeben. Es wurden 1,46 mg LDH in einer Konzentration von 7,3 mg/ml verdaut. Insgesamt wurden 0,29 mg Trypsin zugegeben. Die Verdauung wurde gestoppt durch Zugabe von 0,58 mg Ovomukoid Trypsininhibitor. Zur Stabilisierung der angedauten LDH wurden $0,14 \text{ mg NAD}^{+}$ (10^{-3} M) und $0,0046 \text{ mg Natriumsulfit}$ ($2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) hinzugegeben. Der Ansatz war schon während der Verdauung trübe geworden. Nach Zugabe des Ovomukoids flockte ein Teil des Proteins aus. Der Verdauungsansatz wurde dann gegen $0,2 \text{ M Glycin/NaOH}$ Puffer dialysiert (mit NAD^{+} und Sulfit) und man erhielt eine trübe Suspension. Diese wurde zentrifugiert und der Niederschlag konnte zum Teil in Glycinpuffer mit 40 % DMSO gelöst werden. Man erhielt also folgende Fraktionen:

Überstand; Niederschlag DMSO-löslich; Niederschlag DMSO-unlöslich.

3.1.0. Die Niederspannungselektrophorese der angedauten NPCA-LDH

Die drei Verdauungsfraktionen wurden auf Acetatfolie elektrophoretisch untersucht. ($0,05 \text{ M Glycinpuffer pH } 8,7$ als Elektrodenflüssigkeit, Folien im gleichen Puffer mit Zusatz von NAD^{+} und Sulfit sowie 40 % DMSO eingeweicht)

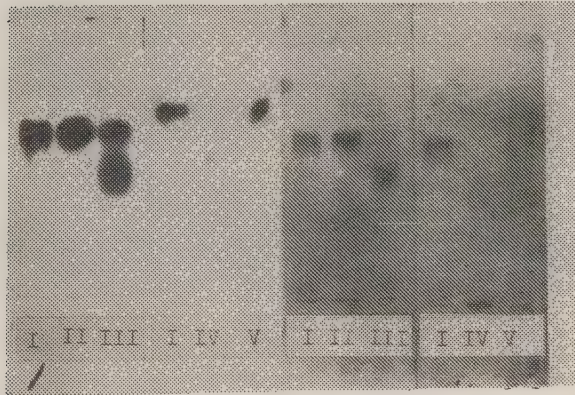
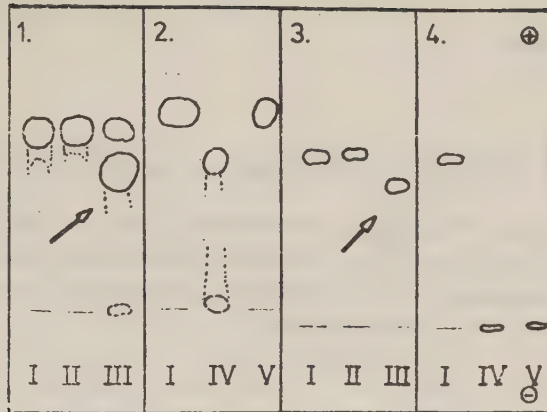


Abb. 45: Acetatfolienelektrophorese

Folie 1) und 2) LDH-spezifische Anfärbung

Folie 3) und 4) proteinspezifische Anfärbung

Fr. I: LDH amidiniert

Fr. II: LDH amidiniert, mit DMSO inkubiert

Fr. III: Verdauung, Niederschlag DMSO-löslich

Fr. IV: Verdauung, Niederschlag DMSO-unlöslich

Fr. V: Verdauung, Überstand

Bei der tryptischen Verdauung der NPCA-LDH entsteht ein Protein mit LDH-spezifischer Aktivität, welches auf der Acetatfolie anders läuft als die nicht angedaute amidinierte LDH.

3.2.0. Die SDS-Diskelektrophorese der angedauten NPCA-LDH⁽¹⁰³⁾

Von den drei Fraktionen der tryptischen Verdauung der amidinierten LDH wurde eine SDS-Diskelektrophorese in 12,5 %igem Gel durchgeführt. Die proteinspezifische Anfärbung ergab folgendes Bild (Abbildung 46).

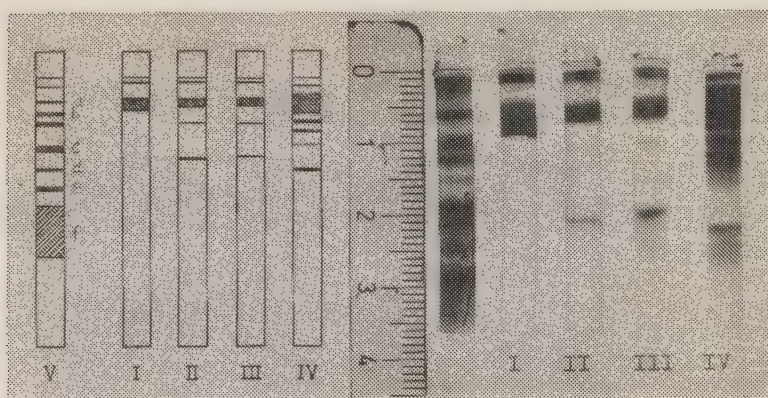


Abb. 46: SDS-Diskelektrophorese

- Pr. I: amidinierte LDH
- Pr. II: Verdauung, Niederschlag DMSO-löslich
- Pr. III: Verdauung, Niederschlag DMSO-unlöslich
- Pr. IV: Verdauung, Überstand
- Pr. V: Standard (a: LDH 36000 D; b: Chymotrypsin, 26000 D; c: Myoglobin, 17000 D; d: Cytochrom C, 11500 D; e: Kallikrein-Inhibitor, 6500 D; f: Insulin B, 3500 D.)

Die Hauptproteinbande in der SDS-Disk hatte nach der Verdauung die gleiche Lage wie unverdaute LDH. Eine sehr schwache Bande trat noch bei 15.000 D auf.

3.3.0. Thermostabilität von tryptisch angedauter NPCA-LDH

Eine über 24 h mit 4 % Trypsin angedaute modifizierte LDH wurde bei 55°C inkubiert und nach verschiedenen Zeiten wurde die Aktivität bestimmt. Zum Vergleich wurde eine genauso angedaute unmodifizierte LDH entsprechend thermisch denaturiert. Die thermische Denaturierung wurde in 0,2 M Glycin-NaOH-Puffer bei pH 8 durchgeführt. Proteinkonzentrationen: angedaute amidinierte LDH: 7,9 mg/ml; amidinierte LDH: 7,28 mg/ml; angedaute unmodifizierte LDH: 9,6 mg/ml; unmodifizierte LDH: 7,1 mg/ml.

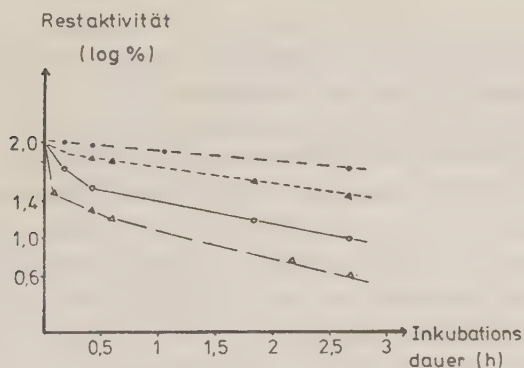


Abbildung 47: Aktivitätsverlust bei thermischer Denaturierung von angedauter LDH, halblogarithmische Auftragung.

unmodifizierte LDH: - - - -

angedaute unmod. LDH: - - - - -

amidinierte LDH: ————

angedaute amidinierte LDH: ——— ———

Tabelle 5:

Halbwertszeiten für den Verlust der katalytischen Aktivität.

angedaute amidinierte LDH anfangs	3 min
nach 30 min	55 min
amidinierte LDH anfangs	10 - 20 min
nach 30 min	75 min
angedaute unmodifiz. LDH	105 min
unmodifizierte LDH	160 min

Nach der tryptischen Verdauung hat sich bei der Kinetik des Aktivitätsverlustes von amidinierter LDH nichts grundlegend geändert. Die Untersuchung der Thermostabilität von ange-dauter NPCA-LDH ergab genauso wie bei der NPCA-LDH einen biphasischen Verlauf des Aktivitätsverlustes. Die Halbwertszeit des labilen Anteils des Enzyms (Anfangsteil der Kinetik) hatte stark abgenommen, und zwar von etwa 15 min auf 3 min. Das heißt also, es ist ein aktives Enzym entstanden, das noch labiler war, als die modifizierte LDH.

3.4.0. Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei der begrenzten Proteolyse der modifizierten LDH trat eine aktive LDH mit zum Teil abweichenden Eigenschaften auf:

1) Löslichkeit

Die Löslichkeit hat weiter abgenommen. In 0,1 M Glycin-puffer ist die angedaute modifizierte LDH nur in Gegen-wart von 40 % DMSO löslich.

2) Beweglichkeit bei der Niederspannungselektrophorese

Die Laufstrecke beträgt nur 75 % von der nicht verdauten modifizierten LDH.

3) Die Molekülgröße

In der Diskelektrophorese ist keine Veränderung des Mole-kulargewichtes sichtbar geworden.

4) Die Thermostabilität

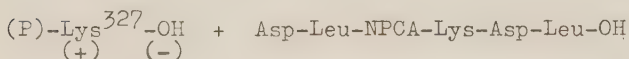
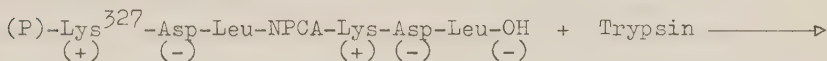
Die Halbwertszeit hat um den Faktor 5 abgenommen.

Die geringere anodische Beweglichkeit nach der Proteolyse kann man a) durch eine Verringerung der negativen Ladung des Proteins erklären; und b) durch eine veränderte Konformation. Diese ist aber weitgehend auszuschließen, da das Enzym seine Aktivität nicht verloren hat. Eine Konformationsänderung hätte bei diesem labilen Enzym sicherlich eine Denaturierung zur Folge und das Protein würde bei der Acetatfolienelektrophorese am Auftragspunkte liegen bleiben.

3.4.1. Diskussion der Ergebnisse

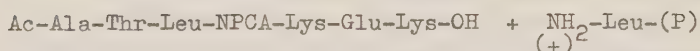
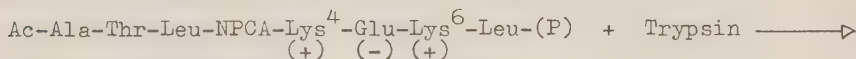
Es zeigte sich, daß die modifizierte LDH langsamer von Trypsin unter Denaturierung angegriffen wurde als unmodifizierte LDH. Außerdem wurden nur ca. 2 % nicht TCA-fällbares Protein freigesetzt, gegenüber einer Freisetzung von 20 % Protein bei unmodifizierter LDH. Die Untersuchung der Thermostabilität von angedauter modifizierter LDH ergab genauso wie bei der modifizierten einen biphasischen Verlauf des Aktivitätsverlustes. Die Halbwertszeit des labilen Anteils des Enzyms hatte stark abgenommen, und zwar von etwa 15 min auf 3 min. Es ist also ein angedautes, noch aktives Enzym entstanden, das eine geringere elektrophoretische Beweglichkeit bei pH 8,7 zeigt. Das Molekulargewicht der Untereinheit blieb aber unverändert. Das bedeutet, daß ein kürzeres Peptidstück vom aminoterminalen oder carboxyterminalen Ende abgespalten worden ist. Jeckel⁽⁵²⁾ zeigte, daß bei der tryptischen Verdauung der NAD⁺/Sulfit geschützten LDH zunächst das aminoterminal Hexapeptid Ac-Ala-Thr-Leu-Lys-Glu-Lys abgespalten wurde. Die NPCA-LDH ist zu einem Teil am Lysin 6 nicht modifiziert (Isolierung von NPCA Lys⁴-Glu-Lys⁶) aber der Angriff des Trypsins könnte durch das fast vollständig modifizierte Lysin⁴ erschwert sein, denn es traten nach 23-stündiger Verdauung nur 5 % der NPCA-Reste im Überstand der TCA-Fällung auf. Die Abspaltung eines aminoterminalen Hexapeptides pro Untereinheit würde dagegen 10 % der NPCA-Reste pro Untereinheit freisetzen.

Die Niederspannungselektrophorese zeigte, daß die angedaute NPCA-LDH eine geringere kathodische Beweglichkeit hat als die nicht angedaute NPCA-LDH. Die Ergebnisse der nativen tryptischen Verdauung der NPCA-LDH interpretiere ich so, daß ein Pentapeptid vom carboxyterminalen Ende der LDH abgespalten worden ist.



Durch die Abspaltung des carboxyterminalen Pentapeptides verringert sich die negative Ladung der angedauten LDH um eine Einheit, da zwei Asparaginsäurereste, aber nur eine basische Aminosäure mit abgespalten werden.

Eine Spaltung am Lysin⁶ würde die Ladung der LDH dagegen nicht verändern:



Die Isolierung des Peptides Asp-Leu-NPCA-Lys-Asp-Leu als eines der Hauptprodukte aus dem chymotryptisch-tryptischen Verdauungsansatz der denaturierten NPCA-LDH zeigt, daß das Lysin³²⁷ zu einem beträchtlichen Anteil in der NPCA-LDH unmodifiziert vorliegt. Das Lysin³²⁷ hat eine sehr exponierte Stellung an der Oberfläche der LDH inne⁽⁷⁴⁾. Die SDS-Disk-elektrophorese ergab, daß der Anteil an mittleren und größeren Spaltprodukten bei der nativen Verdauung der NPCA-LDH vernachlässigbar klein ist. Es ist somit gut möglich, daß bei der Verdauung größtenteils das carboxyterminale Pentapeptid freigesetzt wurde. Die 5 % nicht TCA-fällbaren NPCA-Peptide könnten daher größtenteils aus diesem Peptid bestehen. Das würde bedeuten, daß etwa an jeder zweiten Untereinheit das Lysin³²⁷ nicht modifiziert worden ist und dort gespalten werden kann.

Teil III

Identifizierung der Angriffspunkte des NPCI am Protein

1.0.0. Einleitung

Es gibt keine Literatur-Hinweise dafür, daß bei der Amidierung andere Aminosäuren als Lysine modifiziert werden⁽³¹⁾. Da aber jedes Protein ein Individuum darstellt und über besonders reaktive Aminosäureseitenketten verfügen kann, ist eine Modifizierung anderer Reste bei der LDH nicht auszuschließen. Aus diesem Grunde wurde die NPCA-LDH durch eine salzsaure Hydrolyse in die Aminosäuren gespalten. Das NPCA-Lysin ist, wie nachgewiesen worden war, unter diesen Bedingungen stabil. Parallel dazu wurde eine proteolytische Verdauung der NPCA-LDH durchgeführt.

2.0.0. Nachweis des NPCA-Lysins im NPCA-LDH-Hydrolysat

2.1.0. Salzsaure Hydrolyse

Die Totalhydrolyse einer NPCA-LDH mit 7 Amidinogruppen pro UE wurde 20 h lang in 6 N HCl bei 108°C im geschlossenen Rohr durchgeführt. Im Fingerprint war nur ein einziger gelber Fleck sichtbar, der identisch war mit dem synthetischen Amidinolysin, das im Fingerprint in beiden Dimensionen mitlief. Abbildung 48a.

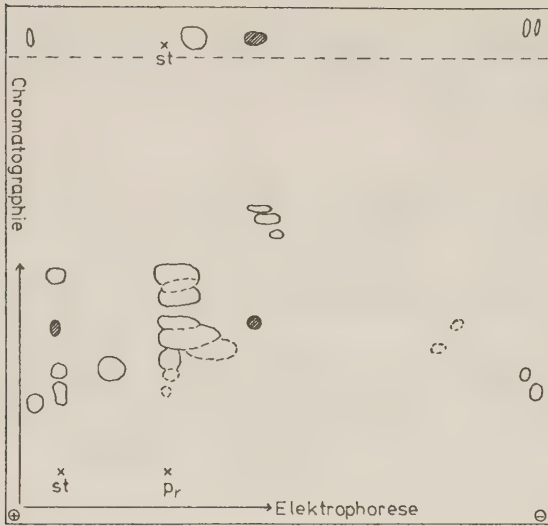


Abb. 48a: Fingerprint der salzsauren Hydrolyse der modifizierten LDH.

Pr.: Probe

St.: Aminosäurenstandard u. ϵ -NPCA-Lysin

▨: gelbe Flecken

2.2.0. Proteolytische Verdauung

Die gleiche modifizierte LDH (7 Amidinogruppen pro UE) wurde nacheinander mit verschiedenen Proteasen verdaut.

Ansatz: 1 mg NPCA-LDH wurde gegen 0,05 M NH_4HCO_3 -Puffer pH 7,7 dialysiert und 30 min bei 100°C hitzedenaturiert. Proteinkonzentration: 2 mg pro ml.

3.0.0. Bestimmung der Gesamtzahl der SH-Gruppen nach Modifizierung

Um eine mögliche Beeinträchtigung von SH-Gruppen während der Modifizierung ausschließen zu können, wurde für die NPCA₈-LDH die Zahl der SH-Gruppen bestimmt.

Eine modifizierte LDH mit 8 Amidinogruppen pro UE wurde in 8 M Harnstoff entfaltet. Mit DTNB wurde die Zahl der SH-Gruppen pro UE bestimmt. Daraus berechnen sich 4,67 SH-Gruppen pro Untereinheit der modifizierten LDH. Das ist der gleiche Wert, der auch für die unmodifizierte LDH gefunden wird. Da keine Abnahme der SH-Gruppen gemessen wurde, kann eine Blockierung an einem reaktiven Cystein ausgeschlossen werden.

4.0.0. Chymotryptisch-tryptische Verdauung der NPCA-LDH

182 mg amidinierte LDH mit 9,4 Amidinogruppen pro UE (4,55 mg/ml), wurden zweimal gegen 2 l 0,1 M NH_4HCO_3 -Puffer pH 7,7 dialysiert. Der Puffer enthielt 0,02 % Azid zur Verhinderung von Bakterienwachstum. Dann wurde das Protein 30 min auf dem siedenden Wasserbad hitzedenaturiert. Der erste Schritt der Verdauung wurde mit Chymotrypsin bei 37°C durchgeführt:

Zugabe zur Zeit t=0	2 % Chymotrypsin
" zur Zeit t=4 h	1 % "
" zur Zeit t=8 h	2 % "
" zur Zeit t=22 h	Verdauung abgebrochen.

Anschließend wurde das Chymotrypsin 20 min lang auf dem siedenden Wasserbad denaturiert. Dann folgte der zweite Schritt der Verdauung mit Trypsin, ebenfalls bei 37°C durchgeführt:

Zugabe zur Zeit $t=0$	2 % Trypsin
" zur Zeit $t=4$ h	3 % Trypsin
" zur Zeit $t=8,5$ h	Verdauung abgebrochen.

Das Trypsin wurde 10 min hitzedenaturiert. Während der ganzen Verdauung blieb die Lösung klar. Das war nicht der Fall, wenn man zunächst tryptisch und dann chymotryptisch verdaute. Weil das Trypsin nach erfolgter chymotryptischer Verdauung noch einzelne Aminosäuren freisetzen kann, dagegen das Chymotrypsin nur große Pentide spaltet, dagegen keine Aminosäuren mehr aus Di- oder Tripentiden freisetzt, habe ich diese Reihenfolge der proteolytischen Verdauung gewählt.

4.1.0. Fingerprint der chymotryptisch-tryptisch verdauten NPCA-LDH

Der Fingerprint wurde auf Kieselgelplatten durchgeführt. Es wurden etwa 0,2 mg verdautes Protein aufgetragen. Als Standard dienten ϵ -Amidinocaprinsäure sowie ein Aminosäurengemisch aus je 5 mg/ml von Asparaginsäure, Isoleucin, Lysin und Arginin in 50%iger Ameisensäure. In der ersten Dimension wurde Elektrophorese in Pyridinacetatpuffer pH 3,2 durchgeführt. In der zweiten Dimension wurde die Chromatographie im Laufmittel II durchgeführt, Abbildung 49). Die gelben Peptide waren gut sichtbar. Anschließend wurden die Aminogruppen mit Ninhydrin angefärbt. Auf der Platte waren mindestens 10 verschiedene gelbe Flecken sichtbar. Das sagte aber noch nichts über die Zahl der Amidinogruppen tragenden Peptide aus, denn in einem Fleck auf der Platte können mehrere Peptide stecken, die sich in ihren elektrophoretischen und chromatographischen Eigenschaften nicht unterscheiden.

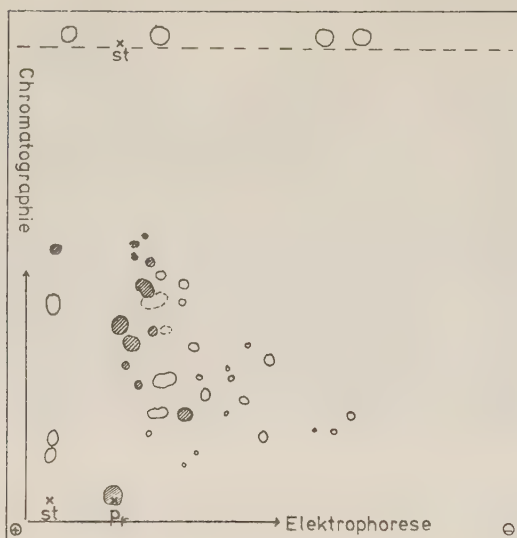


Abb. 49: Fingerprint

St.: Standard aus Aminosäuren und NPCA- ϵ -Aminocapron-
säure

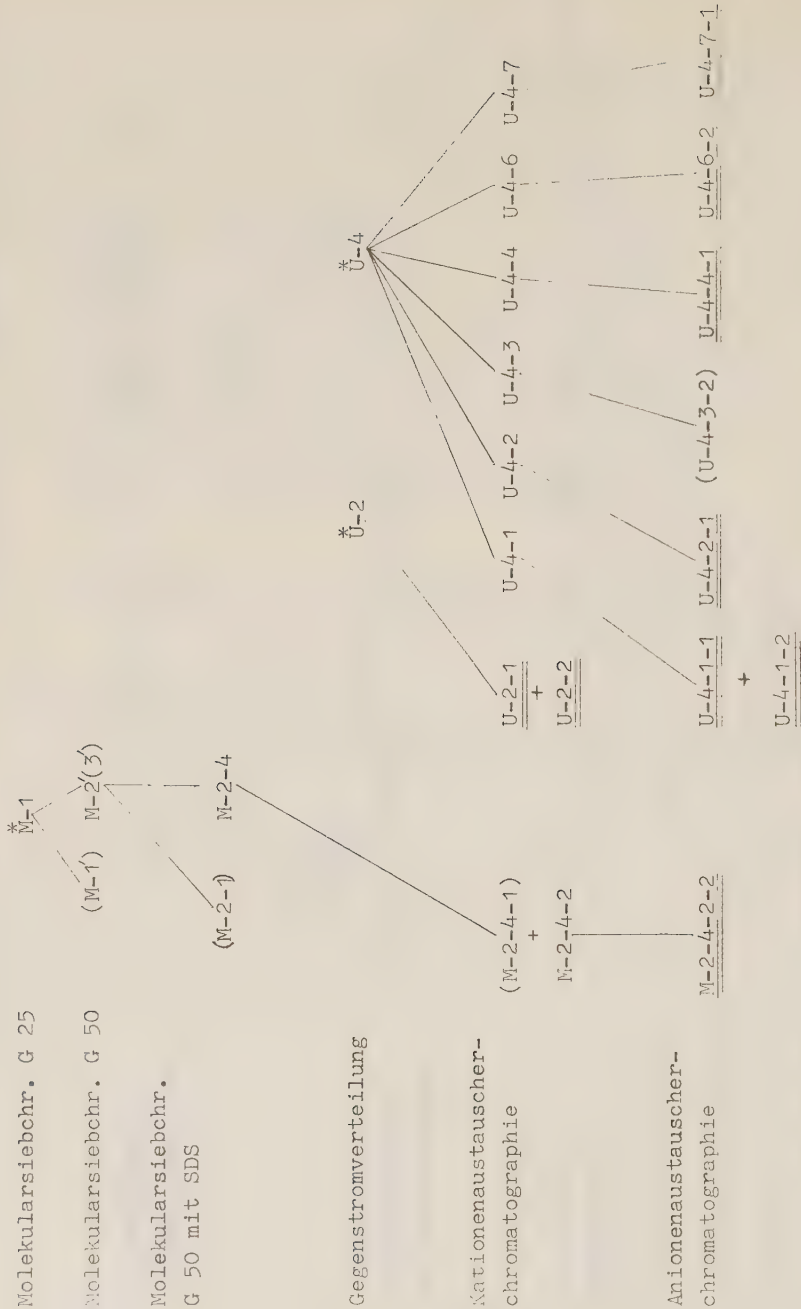
Pr.: Probe

▨ gelbe Flecken

- 85 -

In Tabelle 6b Fortsetzung der mit
gekennzeichneten Peptide

Tabelle 6 b: (Fortsetzung)



5.2.0. Molekularsiebchromatographie auf Sephadex G 25 f

An den Anfang der Trennung der Peptide wurde eine Molekularsiebchromatographie gestellt. Hierbei wurden die im Ausschlußvolumen der Säule erscheinenden großen Peptide von der Mehrzahl der kleineren abgetrennt.

Tabelle 7: Übersicht über den Trennungsschritt

Ausgangsmaterial	gesammelte Fraktion	Charakterisierung	Ergebnis
Verdauungsansatz	M-1		weiter gereinigt
	M-2	Dünnschichtchromatographie	{ zusammen weiter gereinigt
	M-3		

Arbeitsvorschrift:

Der Verdauungsansatz wurde am Rotationsverdampfer auf wenige ml eingeengt. Dann gab man konzentrierte Ameisensäure hinzu, bis sich alles Protein gelöst hatte. Diese dunkelgelb gefärbte Proteinlösung wurde dann auf eine Sephadex G 25f Säule aufgegeben und mit 30% iger Essigsäure eluiert.

Säulendimensionen: 170 cm Füllhöhe; 3 cm Durchmesser

Flußgeschwindigkeit: 70 ml/h

Säulenchromatogramm: Messung bei 366 nm (Chromophor der Amidinogruppe) für 15 mg Protein Abb. 50)

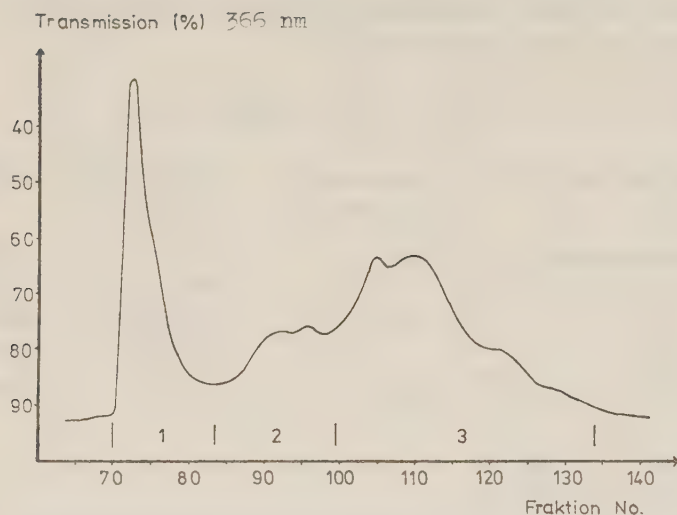


Abbildung 50: Molekularsiebchromatographie des Verdauungsansatzes

5.2.1. Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Molekularsiebfractionen M-1, M-2, M-3

Die Dünnschichtchromatographie wurde auf Kieselgelplatten durchgeführt. Laufmittelsystem: I

Als Standard wurden das Aminosäuregemisch sowie ϵ -Amidino-capronsäure aufgegeben. Die gelben Peptide waren gut sichtbar, die Aminogruppen wurden mit Ninhydrin angefärbt, Abb. 51)

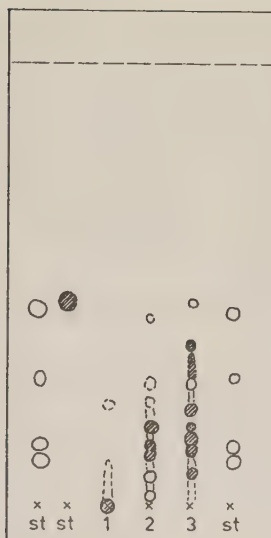


Abbildung 51: Dünnschichtchromatogramm

St.: Aminosäurestandard, NPCA- ϵ -Aminocaprinsäure
 1, 2, und 3: Molekularsiebfrakt. M-1, M-2, M-3
 ▨ : gelbe Flecken

Die Fraktion M-1 enthielt die großen Peptide mit Molekulargewichten um oder über 5000 D oder solche, die aufgrund ihrer geringen Löslichkeit stark aggregieren. Diese Peptide waren nur in verdünnter Ameisensäure bzw. Essigsäure löslich und wurden vom nächsten Aufarbeitungsschritt, der Gegenstromverteilung ausgeschlossen. Die Fraktionen M-2 und M-3 wurden für die weitere Aufarbeitung vereinigt, da zwei Gegenstromverteilungsläufe wegen der großen Mengen an organischen Lösungsmitteln, die man dazu benötigt, zu kostspielig geworden wären.

5.3.0. Gegenstromverteilung der Molekularsiebfraktion M-2,-3

Es ist bekannt, daß manche Peptide, besonders wenn sie wenige geladene Aminosäuren enthalten, leicht an Ionenaustauschermaterialien adsorbiert werden. Im ungünstigsten Fall kann das Peptid nicht mehr vom Ionenaustauscher eluiert werden, im günstigsten Fall gibt es stark verbreiterte Peaks im Elutionsdiagramm. Die NPCA-Peptide tragen einen sehr hydrophoben Rest. Eine Ionenaustauscherchromatographie auf den gängigen Dowexharzen war daher nicht möglich. In diesem Falle bot sich die Reinigung mit Hilfe der Gegenstromverteilung an.

Prinzip der Gegenstromverteilung:

Löst sich eine Substanz in zwei nicht mischbaren Phasen, die im Gleichgewicht stehen, unterschiedlich, dann bezeichnet man den Quotienten aus der Konzentration dieses Stoffes in der Oberphase und aus der Konzentration in der Unterphase als Verteilungskoeffizienten K . Die Trennung verschiedener Substanzen durch Gegenstromverteilung ist möglich, wenn diese unterschiedliche Verteilungskoeffizienten haben. Bei gleichen Volumina an Oberphase und Unterphase und nach einer großen Zahl von Übergängen gibt es folgenden vereinfachten Ausdruck für den Verteilungskoeffizienten.

$$K = \frac{m}{n-m}$$

m : Nummer des Gläschens mit maximaler Konzentration

n : Anzahl der Übergänge

5.3.1. Durchführung der Gegenstromverteilung

Die Fraktionen M-2 und M-3 der Molekularsiebtrennung, vereinigt als M-2,3, wurden in je 20 ml der Ober- und Unterphase gelöst. Es trat ein leichter Niederschlag auf. Dieser wurde abzentrifugiert und noch mehrmals mit den verwendeten Lösungsmitteln ausgewaschen.

Trennsystem: Butanol-1, H_2O , Essigsäure, Pyridin 40:40:3:3

Durchgeführt wurden zunächst 150 Transfers. Zur Identifizierung der amidinierten Peptide wurde die Extinktion bei 366 nm herangezogen. Aus den ersten 70 Gläschen der Apparatur wurden die Fraktionen U-2 und U-4 für die weitere Aufarbeitung entnommen. Trägt man die Extinktion jeder Fraktion gegen die Fraktionsnummer auf, so ergibt sich folgendes Bild, siehe Abbildung 52.

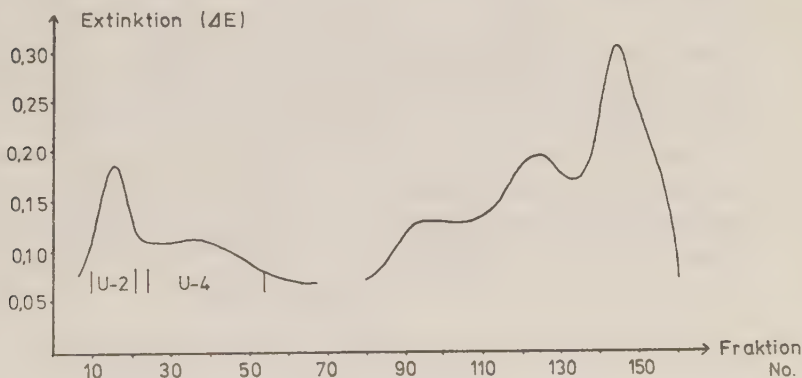


Abbildung 52: Auftragung der Extinktionen aller Fraktionen in der Gegenstromverteilungsanlage gegen die Fraktionsnummern.

Ein Teil der amidinierten Peptide hatte sehr große Verteilungskoeffizienten und wurde mit der organischen Phase transferiert. Die ersten 70 Gläschen wurden nach Entnahme der U-Fractionen wieder mit neuen Lösungsmitteln gefüllt und es konnten weitere 176 Transfers im Recyclingprozeß durchgeführt werden.

Das Recycling wurde durchgeführt, bis sich die amidinierten Peptide über das ganze System verteilt hatten und die Front wieder bis zum Ausgang der Gegenstromverteilungsanlage gelangt war. Um die Auftrennung weiter zu verbessern, wurden zum Schluß 200 Transfers in einen synchron laufenden Fraktions-sammler durchgeführt. Nach Messung der 366 nm Extinktion wurde wieder die Verteilung der amidinierten Peptide festgestellt (Abb. 53a). Die Auftragung der Extinktionen gegen die Fraktionsnummern zeigte nach dem Recycling weitere sechs Peaks, die allerdings nicht vollständig getrennt werden konnten. Zusammen mit den beiden vor dem Recycling gewonnenen Fraktionen U-2 und U-4 konnten also mit Hilfe der Gegenstromverteilung 8 Peptidfraktionen getrennt werden. Eine weitere Auftrennung der gewonnenen Fraktionen wäre mit Hilfe der Gegenstromverteilung möglich gewesen, wie aus den unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten hervorgeht (Tab.: 8). Da aber mit zunehmendem Volumen bei fortgesetzter Verteilung die Extinktionen zu klein geworden wären, wurde auf eine weitere Auftrennung nach dieser Methode verzichtet und die erhaltenen Fraktionen zunächst dünn-schichtchromatographisch auf ihre Zusammen-stzung untersucht.

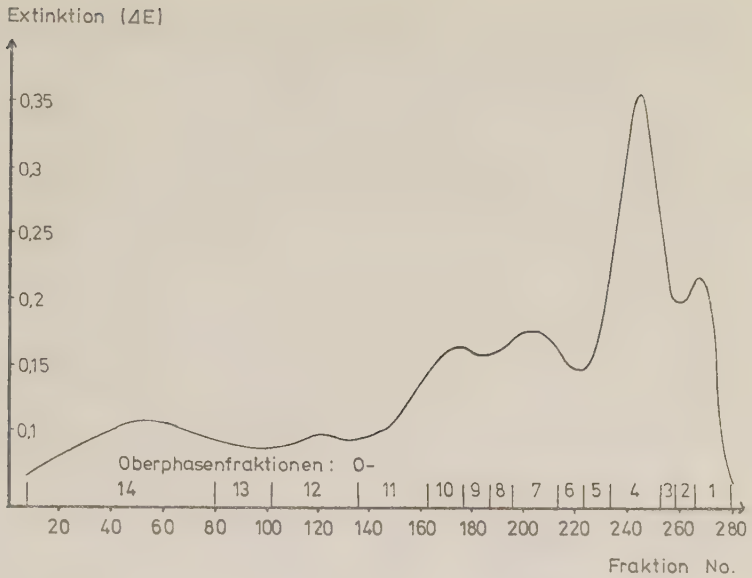


Abb. 53a: Peptidfraktionen nach dem Recycling
Extinktionen bei 366 nm

Tabelle 8: Verteilungskoeffizienten für die Hauptfraktionen

Fraktion	Verteilungskoeffizient
U-2	0,101
U-4	0,284
O-14	1,23
O-7	3,15
O-4	8,05
O-2	26,20

5.3.2. Analytische Dünnschichtchromatographie der Gegenstromverteilungsfractionen

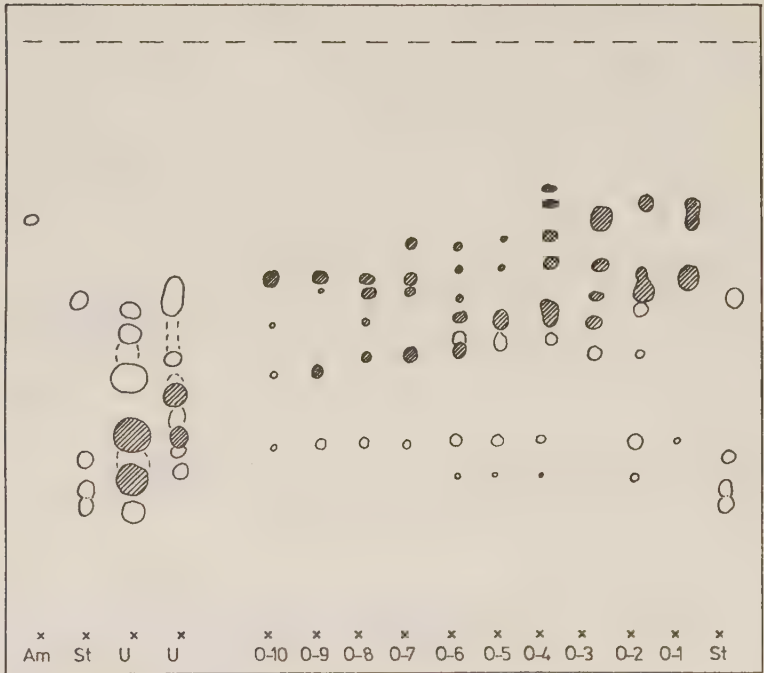


Abbildung 53b: Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel
Laufmittel II

Am: NPCA- ϵ -Aminocapronsäure

St.: Aminosäuren, Lys, Asp,
Ile, Arg

Aufgetragen sind die Fraktionen U-2 und U-4 sowie O-1 bis O-10

▨: gelbe Peptide

Die Fraktionen der Oberphase aus der Gegenstromverteilungsauftrennung waren noch sehr heterogen. Sie enthielten 3 bis 5 verschiedene NPCA-Peptide neben einigen weiteren Peptiden ohne NPCA-Rest. Die Fraktionen der Unterphase enthielten nur eine geringe Zahl von NPCA-Peptiden, dagegen die Hauptmenge der übrigen nicht modifizierten Peptide. Die Zahl der amidinierten Peptide war bedeutend größer als die zehn Peptide, die im Fingerprint direkt nach der chymotryptisch-tryptischen Verdauung getrennt wurden. Das beruhte auf der geringeren Beweglichkeit der NPCA-Peptide im Elektrophoreseschritt des Fingerprints. Die starke Adsorption an das Kieselgel konnte nur durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln unterdrückt werden. Andererseits aber verhielten sich verschiedene NPCA-Peptide im Chromatographieschritt des Fingerprints sehr ähnlich und gaben gleiche R_F -Werte.

Die Abbildung 53b zeigt, daß Peptide, die in dem Gegenstromverteilungsschritt getrennt wurden und unterschiedliche Verteilungskoeffizienten haben, wie zum Beispiel O-1 und O-10 bzw. U-2 und U-4 gleiche R_F -Werte besitzen.

Tabelle 9: Übersicht über den Trennschritt

Ausgangsmaterial	Peptidfraktionen	Charakterisierung
M-2,3	U-2, U-4	
	O-1, O-2, O-3	Dünnschicht-
	O-4, O-5, O-6	chromatographie
	O-7, O-8, O-9	
	O-10	

Für die weitere Aufarbeitung wurden benachbarte Fraktionen der Gegenstromverteilung, die die gleichen Peptide enthielten, vereinigt und zusammen weiter aufgearbeitet:

O-1 und O-2	ergab O-2'
O-4	" O-4'
O-6, O-7 und O-8	" O-7'
O-13 und O-14	" O-14'
O-11 und O-12	" O-12'
O-9 und O-10	" O-10'

Die Fraktion O-10' enthielt nach der Dünnschichtchromatographie Peptide, die auch in den Fraktionen O-7' bzw. O-12' enthalten waren und brauchte nicht weiter untersucht zu werden. Die übrigen hier nicht aufgeführten Fraktionen waren sehr klein und außerdem zu heterogen. so daß eine weitere Aufarbeitung als nicht sinnvoll erschien.

5.4.0. Präparative Dünnschichtchromatographie

Die gute Auftrennung der Fraktionen O-2' bis O-14' in eine Vielzahl gelber Flecken bei der analytischen Dünnschichtchromatographie führte dann zu der Überlegung, daß eine präparative Auftrennung dieser Fraktionen auf Kieselgel vorteilhaft sein müßte. Im Prinzip liegt der Dünnschichtchromatographie der gleiche Trenneffekt zugrunde wie der Gegenstromverteilung. Die wäßrige stationäre Phase ist an das Kieselgel adsorbiert. Das aufsteigende organische Lösungsmittel ist die zweite Phase. Die Zahl der Trennstufen ist aber auf dem Kieselgel wegen der winzigen Dimensionen beider Phasenvolumina bedeutend größer. Hinzu kommt ein gewisser Adsorptionseffekt, den das Kieselgel auf die Peptide ausübt.

Durchführung der Auftrennung:

Die Probe wurde jeweils als feine Linie mit einer Kapillare auf die Kieselgelplatte aufgetragen. Entwickelt wurde mit dem Laufmittel II und zwar nach einem Durchflußverfahren, bis die erste Bande sich dem Rand der Platte näherte. Die amidinierten Peptide waren schon durch ihre Eigenfärbung als gelbe Linien sichtbar. Die Banden wurden herausgekratzt und die Peptide mit 30%iger Essigsäure vom Kieselgel gelöst.

Tabelle 10: Peptidfraktionen der präparativen dünnschichtchromatischen Trennung

Ausgangsmaterial	aufgetrennte Fraktion	Charakterisierung
0-2'	0-2-1	weiter aufgearbeitet
0-4'	0-4-2	"
	0-4-3	"
	0-4-5	"
0-7'	0-7-1	sauber
	0-7-3	weiter aufgearbeitet
	0-7-4	"
0-14'	0-14-1	"
	0-14-3	"
	0-14-8	sauber

Da diese Peptide dünnschichtchromatographisch getrennt worden sind, erschien mir der dünnschichtchromatographische Nachweis auf Einheitlichkeit überflüssig, besonders da die Durchflußchromatographie bessere Trennschärfe ergibt, als die normale analytische aufsteigende Chromatographie. Trotzdem erwiesen sich die meisten Peptide in der Aminosäureanalyse als nicht einheitlich.

5.5.0. Kationenaustauscherchromatographie

Die dünnsschichtchromatographisch vorgereinigten Fraktionen 0-2-1, 0-4-2, 0-4-3, 0-4-5, 0-7-3, 0-7-4, 0-14-1, 0-14-3 wurden weiter aufgetrennt. Außerdem wurde die Fraktion 0-12* aus der Gegenstromverteilung aufgetrennt.

Die Fraktionen wurden über einen 0,6 x 30 cm Kationenaustauscher SE-Sephadex C 25 (die mit * gekennzeichnete Fraktion über eine längere Säule, 1 x 80 cm) getrennt.

Eluiert wurde mit einem Pyridinacetatgradienten mit steigendem pH unter Zusatz von Propanol. Das Propanol ist wichtig, denn es erhöht die Löslichkeit der Peptide.

Tabelle 11: Peptidfraktionen nach der Kationenaustauscherchromatographie

Ausgangsmaterial	gereinigtes Peptid	Charakterisierung	Tabelle
0-2-1	0-2-1-2	abgebrochen	22
0-4-2	0-4-2-3-	"	22
0-4-3	0-4-3-a	sauber	18
0-4-5	0-4-5-1	weiter gereinigt	
	0-4-5-2	sauber	18
0-7-3	0-7-3-a	sauber	23
0-7-4	0-7-4-a	abgebrochen	19
0-14-a	0-14-1-a	sauber	19
0-14-3	0-14-3-a	sauber	19
0-12*	0-12-2	sauber	18
	0-12-3	weiter gereinigt	

Die beiden Fraktionen U-2 und U-4 aus der Unterphase der Gegenstromverteilung wurden ohne vorherige dünnsschichtchromatographische Reinigung über eine 1 cm X 80 cm Kationenaustauschersäule mit SE-Sephadex C 25 gereinigt. Eluiert wurde mit einem linearen Pyridinacetatgradienten mit steigendem pH unter Zusatz von Propanol.

Tabelle 12: Peptidfraktionen nach der Kationenaustausch-
chromatographie

Ausgangsmaterial	gereinigtes Peptid	Charakteri- sierung	Tabelle
U-2	U-2-1	sauber	20
	U-2-2	sauber	20
U-4	U-4-1	weiter gereinigt	
	U-4-2	"	
	U-4-3	"	
	U-4-4	"	
	U-4-6	"	
	U-4-7	"	

5.6.0. Anionenaustauscherchromatographie

Die Peptidfraktionen, die über den Kationenaustauscher nicht vollständig gereinigt werden konnten, wurden über einen Anionenaustauscher chromatographiert.

Es wurde ein 0,6 x 30 cm Anionenaustauschersäule mit DEAE-Sephadex A 25 verwendet. Mit einem N-Äthylmorpholin-, α -Picolin-, Pyridinacetatpuffer mit abnehmendem pH wurde eluiert. Zur besseren Löslichkeit der Peptide wurde ebenfalls Propanol hinzugegeben.

Tabelle 13: Peptidfraktionen der Anionenaustauschchromatographie

Ausgangsmaterial	gereinigtes Peptid	Charakterisierung	Tabelle
0-4-5-1	0-4-5-1-a	sauber	18
0-12-3	0-12-3-1	sauber	18
	0-12-3-2	sauber	19
U-4-1	U-4-1-1	sauber	20
	U-4-1-2	sauber	20
U-4-2	U-4-2-1	sauber	21
U-4-3	U-4-3-2		23
U-4-4	U-4-4-1	sauber	21
U-4-6	U-4-6-2	sauber	21
U-4-7	U-4-7-1	sauber	21

5.7.0. Aufarbeitung der "großen" Peptide

Nach der Auftrennung der proteolytisch gewonnenen Peptidmischung auf Sephadex G 25 f wurden die Fraktionen M-2 und M-3 durch die Gegenstromverteilung weiter aufgetrennt. Die Fraktion M 1 war aber nur in verdünnter Essigsäure löslich, deshalb wurde diese Fraktion gesondert aufgearbeitet.

5.7.1. Molekularsiebchromatographie auf Sephadex G 50 f

Die Peptidfraktion M-1 kam bei der G 25f-Molekularsiebchromatographie im Ausschlußvolumen. Deshalb wurde im folgenden die Molekularsiebchromatographie auf G 50f durchgeführt.

Tabelle 14: Übersicht über den Trennungsschritt

Ausgangsmaterial	gesammelte Fraktion	Charakteri- sierung	Ergebnis
M-1	M-1'	SDS-Disk-	
	M-2'	elektro-	M-2' und
	M-3'	phorese	M-3' sind
			identisch

Vorschrift:

Die Fraktion wurde in konzentrierter Ameisensäure gelöst und auf einer 3 cm x 180 cm Sephadex G 50 f Säule aufgetrennt; das Elutionsmittel war 30%ige Essigsäure.

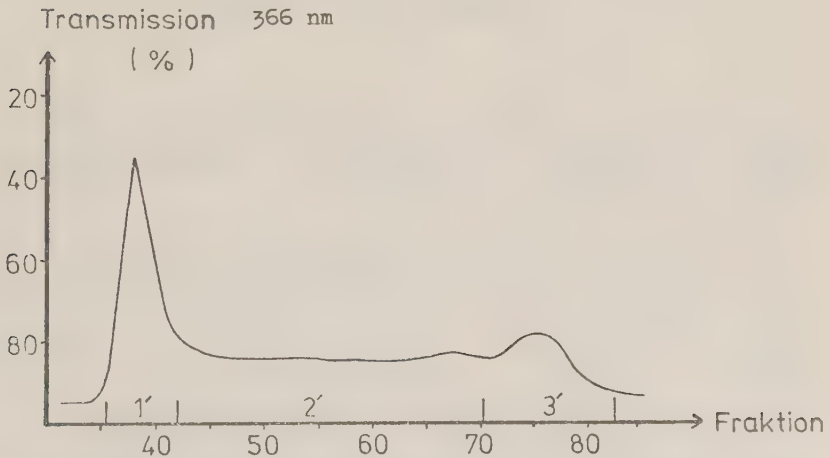


Abb. 54: Elutionsdiagramm

Fr. M-1' Fr. M-2' Fr. M-3'

Diskelektrophorese der Fraktionen M-1', M-2' und M-3'

In 12,5%igem Acrylamidgel (15:1 vernetzt) wurde eine SDS-Diskelektrophorese durchgeführt.

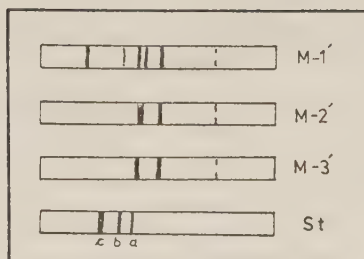


Abb. 55: SDS-Diskelektrophorese M-1', M-2' und M-3' sind die Fraktionen der G50 Molekularsiebchrom.

Standard: a: Kallikreininhib. 6500 D
b: Cytochrom C; c: Myoglobin

Ergebnis:

M-2' und M-3' waren identisch und konnten zusammen weiter aufgearbeitet werden. In der Fraktion M-1' zeigten sich dagegen andere Banden.

Die Fraktion M-1' kam im Ausschlußvolumen der Sephadex G 50-Säule, wo normalerweise globuläre Proteine mit einem Molekulargewicht von 30.000 D eluiert werden. Das bedeutet, daß dieses Material entweder weitgehend unverdaut ist (dagegen sprechen die Ergebnisse der SDS-Diskelektrophorese, obwohl auch ein Teil des Proteins über dem Gel liegen blieb), oder die Peptide aggregieren so stark, daß sie im Ausschlußvolumen der Säule erscheinen. Also erschien es mir nicht lohnend, die Fraktion M-1' noch weiter zu untersuchen. Die Fraktionen M-2' und M-3' wurden vereinigt zur Fraktion M-2'(3'). M-2'(3') wurde in Gegenwart von SDS in Triäthylaminacetatpuffer pH 8 gelöst und dann mit Mercaptoäthanol behandelt. Denn bei der vorher durchgeführten Molekularsiebchromatographie zeigte die Fraktion M-2' im Gegensatz zur SDS-Diskelektrophorese als eine über das Gel verschmierte

Proteinbande. Durch die Behandlung mit Mercaptoäthanol und mit Natriumdodecylsulfat wollte ich zwei Dinge erreichen, einmal mögliche S-S-Brücken reduzieren und zum andern an das Protein genügend SDS adsorbieren, um es bei der darauf folgenden Molekularsiebchromatographie zu desaggregieren.

Vorschrift:

Die Fraktion M-2'(3') wurde in 0,05 M Triäthylamin-acetatpuffer pH 8 suspendiert und durch Zugabe von 3% SDS und 4 M Harnstoff gelöst. Dann wurde 5 % Mercaptoäthanol hinzugegeben und die nun gelöste Peptidmischung darin 24 h bei 23°C gelassen.

5.7.2. Erneute Molekularsiebchromatographie der mit Mercaptoäthanol und SDS behandelten Protein-Fraktion M-2'(3')

Tabelle 15: Übersicht über den Trennungsschritt

Ausgangsmaterial	gesammelte Fraktion	Charakterisierung	Ergebnis
M-2'(3')	M-2-2		
	M-2-3	SDS-Disk-	M-2-3
	M-2-4	Elektro-	und
	M-2-5	phorese	M-2-4 identisch

Vorschrift:

Die mit Mercaptoäthanol und SDS behandelte Fraktion M-2'(3') wurde auf einer 3 cm x 180 cm Sephadex G 50 f Säule aufgetrennt. Das Elutionsmittel war 30%ige Essigsäure.

Es ergab sich folgendes Elutionsdiagramm, Abbildung 56):

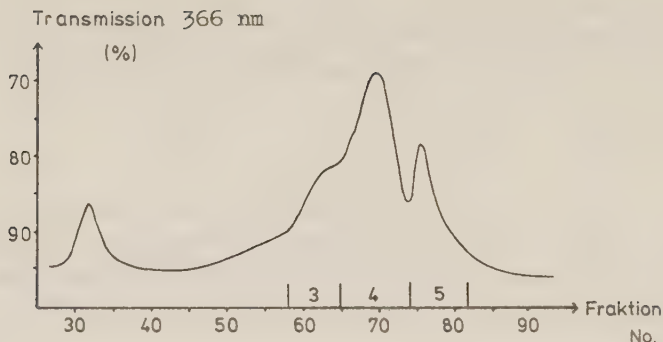


Abb. 56: Elutionsdiagramm

2) : Fr. M-2-2

3) : Fr. M-2-3

4) : Fr. M-2-4

5) : Fr. M-2-5

Es wurden die Fraktionen M-2-2 bis M-2-5 gesammelt.

Es wurde eine SDS-Diskelektrophorese der Fraktionen M-2-2 bis M-2-5 in 12,5%igem Acrylamidgel durchgeführt und festgestellt, daß die Fraktionen M-2-3 und M-2-4 die gleiche Zusammensetzung hatten und zusammengegeben werden konnten.

Es resultiert daraus die Fraktion M-2-(3)4

Die Fraktion M-2-(3)4 enthielt noch viel SDS.

Die Säulenchromatographie der Fraktion M-2(3) ergab ein Elutionsdiagramm ohne die vom Ausschlußvolumen bis zum Elutionsvolumen verschmierte Bande. Die gute Trennung führte ich weniger auf eine Reduktionen von Cystingruppen zurück, sondern mehr auf eine Desaggregation der Peptide durch das noch an das Peptid adsorbierte SDS. Denn beim Lyophilisieren der Fraktionen machte sich das SDS durch starkes Schäumen bemerkbar. Beim Lösen des Lyophilisats in verdünnter Ameisensäure fiel das SDS als weißer Niederschlag aus und konnte teilweise vom gelösten gelben Peptid abgetrennt werden. Um

das SDS vollständig abzutrennen und das Peptid weiter zu reinigen, wurde als nächstes eine Kationenaustauscherchromatographie durchgeführt. Um das Peptid vollständig zu reinigen, mußte zum Schluß noch eine Anionenaustauscherchromatographie durchgeführt werden.

5.7.3. Kationenaustauscherchromatographie von der Peptidfraktion M-2-(3)4

Die Auftrennung wurde auf einer 1 cm x 80 cm langen SE-Sephadex C 25 Säule durchgeführt. Es wurde dazu ein linearer Pyridinacetatgradient angelegt.

Tabelle 16: Übersicht über den Trennungsschritt

Ausgangsmaterial	gesammelte Fraktion	Charakterisierung	Ergebnis
M-2-(3)4	M-2-4-1	zu wenig	abgebrochen
	M-2-4-2	Aminosäureanalyse	weiter gereinigt

Da die Fraktion M-2-4-2 noch nicht einheitlich war, wurde sie weiter gereinigt.

5.7.4. Anionenaustauscherchromatographie von M-2-4-2

Die Chromatographie wurde auf einer 0,6 cm x 30 cm langen DEAE-Sephadex A 25 Säule mit dem üblichen sigmoidalen Gradienten durchgeführt.

Tabelle 17: Übersicht über den Trennschritt

Ausgangsmaterial	gesammelte Fraktion	Charakteri- sierung	Ergebnis
M-2-4-2	M-2-4-2-1	zu wenig	abgebroche
	M-2-4-2-2	Aminosäure- analyse	sauber

Die Aminosäureanalyse zeigte, daß die Fraktion M-2-4-2-2 einheitlich war, die Analysenwerte stehen in Tabelle 19.

6.0.0. Aminosäureanalysen

6.1.0. Aminosäureanalysen von sauberen Peptiden

Tabelle 18:

Aminosäureanalysen von Peptiden, die zugeordnet werden können. Werte nach 24 h bzw. nach 72 h * Hydrolyse. Angegeben sind die Aminosäurenverhältnisse, bezogen auf NPCA-Lys = 1,00 spektroskopisch bestimmt. Aminosäuren unter 0,2 sind nicht angegeben.

	0-4-3-a	0-4-5-1-a	0-4-5-2	0-7-1	0-7-3-a	0-12-2	0-12-3-1
Asp		2,06		1,87			
Thr		1,09					
Ser							
Glu	1,02	1,34	1,04			1,19	
Pro		1,05					
Gly							
Ala		1,12				0,88	
Val	0,98	0,53					
Met						0,64	0,82
Ile	0,72*	0,47					
Leu	0,93*		0,89	2,12		0,93	
Tyr		0,72					
Phe					0,90		
His							
Lys							
Arg							
NPCA-							
Lys	1,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Tabelle 19

Aminosäureanalysen von Peptiden, die zugeordnet werden können. Angegeben sind die Aminosäurenverhältnisse, bezogen auf NPCA-Lys = 1,00, spektr. bestimmt. AS unter 0,2 sind nicht angegeben.

	0-12-3-2	0-14-1-a	0-14-3-a	0-14-8	M-2-4-2-2
Asp	2,04	0,95	0,92		2,84
Thr	0,95				0,97
Ser	1,35				1,12
Glu			0,83	0,97	3,00
Pro					
Gly			0,89	0,89	
Ala	1,07				1,05
Val					1,34
Met				1,18	
Ile			0,70		0,43
Leu	0,98	1,02	0,79		1,93
Tyr					
Phe					
His					
Lys					0,97
Arg					
NPCA-Lys	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Tabelle 20:

Aminosäureanalyse von Peptiden, die zugeordnet werden können. Werte nach 24 h bzw. nach 72 h * Hydrolyse. Angegeben sind die Aminosäurenverhältnisse, bezogen auf NPCA-Lys = 1,00, AS unter 0,2 sind nicht angegeben.

	U-2-1	U-2-2	U-4-1-1	U-4-1-2
Asp			1,90	2,02
Thr			0,90	
Ser		1,08		
Glu	0,97		1,07	2,11
Pro		0,97	0,82	
Gly		1,22		
Ala			0,97	0,98
Val			0,89*	0,87
Met				
Ile			0,75*	
Leu		0,78		1,30
Tyr			0,73	
Phe				
His		0,77		
Lys	0,90		0,98	
Arg		0,73		
NCPA-Lys	1,00	1,00	1,00	1,00

Tabelle 21

Aminosäureanalysen von Peptiden, die zugeordnet werden können, nach 24 h bzw. nach 72 h* Hydrolyse. Angegeben sind die Aminosäurenverhältnisse, bezogen auf NPCA-Lys = 1,00; AS unter 0,2 sind nicht angegeben. Außerdem nicht Ser und Gly, wenn entsprechende Mengen Ornithin vorhanden (Handbook of Biochemistry⁽⁹²⁾).

	U-4-2-1*	U-4-4-1	U-4-6-2	U-4-7*-1
Asp	2,00	1,09		
Thr				
Ser				
Glu			1,28	1,06
Pro				
Gly				
Ala	0,99			
Val			0,87	
Met				
Ile				
Leu				0,90
Tyr	0,62*			
Phe				
His			0,93	
Lys				0,98
Arg				
NPCA-Lys	1,00	1,00	1,00	1,00

6.2.0. Aminosäureanalysen von nicht vollständig gereinigten Peptiden

Tabelle 22: Aminosäureanalysen von Peptiden, die auf Grund der Analysen noch nicht sauber sein können. Die weitere Reinigung konnte nicht verfolgt werden, da nicht mehr genügend Material vorhanden war. Angegeben sind die Aminosäureverhältnisse, bezogen auf NPCA-Lys = 1,00. Hydrolysezeiten: 24 h.

	0-4-1	0-4-2-3	0-2-1-2
Asp		0,65	0,91
Thr			
Ser	0,23	1,22	0,50
Glu	0,73	1,70	0,74
Pro			
Gly			0,95
Ala		1,17	0,59
Val	0,59	0,76	1,02
Met		0,87	
Ile	0,28	0,61	
Leu	1,08	1,85	1,54
Tyr			0,23
Phe			
His			
Lys		0,85	
Arg			
NPCA-Lys	1,00	1,00	1,00

Tabelle 23

Aminosäureanalysen von Peptiden, die nicht weiter gereinigt werden konnten, da nicht genügend Material zur Verfügung stand. Das Peptid O-4-2-2 hat höchstwahrscheinlich Ser, Gly und Ala als Verunreinigungen, seine Zusammensetzung lautet dann: Glu, Val, Ile, NPCA-Lys und Leu; es hat also die gleiche Zusammensetzung wie das gereinigte Peptid O-4-3-a.

	O-4-2-2	O-7-4-a	U-4-3-2
Asp		0,96	2,35
Thr		0,44	0,62
Ser	0,44	0,32	1,17
Glu	1,21	0,67	0,85
Pro			2,14
Gly	0,24	0,34	0,93
Ala	0,32	0,53	1,25
Val	0,61	0,38	1,14
Met			0,41
Ile	0,55	0,24	0,38
Leu	1,19		1,50
Tyr		0,2	1,02
Phe			
His			0,39
Lys			0,34
Arg			0,41
NPCA-Lys	1,00	1,00	1,00

Tabelle 24: Aufstellung der isolierten Peptide

Peptid No.	Aminosäurezusammensetzung
U-2-1	NPCALys, Glx, Lys
O-4-5-2	NPCALys ₂ , Glx, Leu
O-14-8	NPCALys, Gly, Glx, Met
U-4-1-1	NPCALys, Glx, Thr, Pro, Ile, Val, Ala, Asx ₂ , Lys, Tyr
U-4-2-1	NPCALys, Ala, Asx ₂ , Tyr
O-4-5-1-a	NPCALys ₂ , Glx, Thr, Pro, Ile, Val, Ala, Asx ₂ , Tyr
O-7-3-a	NPCALys, Phe
U-2-2	NPCALys, Ser, Gly, Leu, Pro, His, Arg
O-12-2	NPCALys, Met, Ala, Glx, Leu
U-4-6	NPCALys, Glx, Val, His
O-12-3-1	NPCALys, Met
O-4-3-a	NPCALys, Glx, Val, Ile, Leu
M-2-4-2-2	NPCALys, Thr, Ser, Val ₂ , Ile, Asx ₃ , Glx ₃ , Leu ₂ , Ala, Lys
U-4-1-2	NPCALys, Asx ₂ , Glx ₂ , Val, Ala, Leu
U-4-4	NPCALys, Asx
O-12-3-2	NPCALys, Asx ₂ , Ser, Ala, Thr, Leu
O-14-3-a	NPCALys, Gly, Ile, Glx, Asx, Leu
O-7-1	NPCALys, Asx ₂ , Leu ₂
O-14-1-a	NPCALys, Asx, Leu

7.0.0. Bestimmung der sauren Aminosäuren durch Elektrophorese

Die Aminosäureanalysen erlauben keine eindeutige Aussage darüber, ob die Peptide saure Aminosäuren wie Asp oder Glu enthalten, oder deren Amide Asn oder Gln, da während der Totalhydrolyse diese Säureamidbindung ebenfalls gespalten wird. Für die Zuordnung der gefundenen Peptide ist die Ermittlung der sauren Aminosäuren wichtig. Eine Unterscheidung zwischen den genannten Aminosäuren ist mit Hilfe der Elektrophorese bei pH 6,4 möglich.

Durchführung der Elektrophorese:

Die isolierten Peptide wurden in 5%iger Ameisensäure gelöst und jeweils 10 bis 20 nMol auf eine 20 x 20 cm Kieselgelplatte aufgetragen. Die Elektrophorese wurde 2 Stunden mit 1000 Volt (25 mA) im Elektrophoresesystem III mit 15 % Propanol bei pH 6,4 durchgeführt.



Abb. 57: Elektrophorese der Peptide bei pH 6,4

St: NPCA- ϵ -Aminocaprinsäure, Lys, Ile, Arg

Tabelle 25:

Ergebnisse der Elektrophorese

Peptid	Mobilit. rel. Lys	Lauf- richtg.	Gesamt- Ladung	Peptidzusammensetzung nach Gesamtladung
NPCALys	0,024	nach (-)	+ 1	NPCALys
O-7-3	0,024	" (-)	+ 1	NPCALys,Phe
O-12-3-1	0,026	" (-)	+ 1	NPCALys,Met
U-4-4-1	0,019	" (-)	+ 1	NPCALys,Asn
U-4-7-1	0,018	" (-)	+ 1	NPCALys,Glu,Lys,Leu
U-2-1	0,027	" (-)	+ 1	NPCALys,Glu,Lys
U-4-2-1	0	0	0	NPCALys,Ala,Asn,Asp,Tyr
U-4-6	0,020	" (-)	+ 1	NPCALys,Gln,Val,His
O-14-1*	0	0	0	NPCALys,Asn,Leu
U-4-1-2	0,008	" (+)	- 1	mindestens 2 saure Aminosäuren

Die übrigen Peptide blieben unter den Elektrophoresebedingungen am Auftragspunkt liegen, da die Adsorption an das Kieselgel auch durch Zugabe von 15 % Propanol nicht unterdrückt werden konnte. Für diese Peptide konnte keine Aussage über die Ladung gemacht werden.

* Die Elektrophorese von O-14-1 wurde auf einer Polygram CEL 300 Platte durchgeführt. Pyridin-acetat Puffer pH 6,4; 2000 V, 10 mA, 20 min, Kühlung 4 1/2.

8.0.0. Endgruppenbestimmungen

Aufgrund der Aminosäureanalysen der isolierten Peptide wurden diese bestimmten Sequenzen in der Schweineherz LDH zugeordnet. Als zusätzliche Information konnte ich die Spaltungsspezifität des eingesetzten Trypsins und Chymotrypsins heranziehen. Enthielt das Peptid Lysin und Arginin sowie Tyrosin und Phenylalanin, so durfte man davon ausgehen, daß diese Aminosäuren am Carboxylende standen. Da die Proteolyse sehr lange (8 h) mit Chymotrypsin durchgeführt worden war, konnten auch Leucin, Methionin, Asparagin und Histidin u.a. als carboxyterminale Aminosäuren in Peptiden auftreten.

Um die Zuordnung meiner gefundenen Peptide abzusichern, habe ich mit Hilfe der Dansylmethode die aminoterminalen Endgruppen in den Peptiden bestimmt. Die Durchführung erfolgte nach der Methode von Woods und Wang^(58,59).

8.1.0. Aminoterminalen Endgruppen

Die Bestimmung der aminoterminalen Endgruppen erfolgte nach der Dansylmethode, wobei die Dansylaminosäuren nach zweidimensionaler Chromatographie auf Polyacrylamidplatten identifiziert wurden.

Als Referenzsubstanz wurde das Reaktionsprodukt der Umsetzung von Dansylchlorid mit ϵ -NPCA-Lysin, das α -Dansyl- ϵ -NPCA-Lysin benötigt. Diese Verbindung wurde aus ϵ -NPCA-Lysin und Dansylchlorid synthetisiert und über einen 0,6 cm x 30 cm Kationenaustauscher SE-Sephadex C 25 gereinigt. Diese Verbindung fluoresziert nicht mehr, kann aber aufgrund ihrer intensiven gelben Farbe noch in Mengen von 3 nMol gut identifiziert werden, da sie im Fingerprint völlig andere R_F -Werte als das ϵ -NPCA-Lysin zeigt.

Tabelle 26: aminoterminale Endgruppen der Peptide

Peptid No	Aminosäuresequenz	Aminoterminale Aminosäure
U-2-1	NPCALys ⁴ -Lys ⁶	NPCA-Lys
O-4-5-2	NPCALys ⁴ --Leu ⁷	NPCA-Lys
O-14-8	NPCALys ⁶⁰ --Met ⁶³	NPCA-Lys
U-4-1-1	Gln ⁷⁴ --NPCALys ⁷⁷ -----Tyr	kein Ergebnis
O-4-5-1-a	Gln ⁷⁴ --NPCALys ⁷⁷ ----NPCALys ⁸² -Tyr	"
U-4-2-1	Ala ⁸⁰ -NPCALys ⁸² -Tyr	*Ala
O-7-3-a	NPCALys ¹²¹ Phe	NPCA-Lys
U-2-2	Ser ¹⁵³ ---NPCALys ¹⁵⁷ -Arg ¹⁵⁹	kein Ergebnis
O-12-2	Met ¹⁷⁶ --NPCALys ¹⁷⁹ Leu	Met
U-4-6-2	NPCALys ²²⁶ --His ²²⁹	NPCA-Lys
O-12-3-1	NPCALys ²³⁰ Met	NPCA-Lys
O-4-3-a	Glx ²³⁸ --NPCALys ²⁴¹ Leu	Glx
M-2-3-2-2	Thr ²⁹⁹ -----NPCALys ³⁰⁶ -----Leu ³¹⁴ Thr	
U-4-1-2	NPCALys ³⁰⁸ -----Leu ³¹⁴	NPCA-Lys
U-4-4-1	NPCALys ³¹⁶ Asn	NPCA-Lys
O-12-3-2	NPCALys ³¹⁶ -----Leu ³²²	
O-14-3-a	Gly ³²⁴ --NPCALys ³²⁷ -Leu	*Gly
O-7-1	Asx ³²⁸ -NPCALys ³³⁰ -Leu ³³²	Asx
O-14-1-a	NPCALys ³³⁰ -Leu ³³²	NPCA Lys
U-4-7-1	Lys ⁴ --NPCALys ⁶ -Leu ⁷	Lys

Das Zeichen * bedeutet: Bei zwei Peptiden wurde die aminoterminale Aminosäure nach Dansylierung und Totalhydrolyse nach der subtraktiven Methode nachgewiesen. Bei diesem Verfahren werden die Aminosäureanalysen vor und nach der Dansylierung verglichen. Die fehlende Aminosäure nach der Dansylierung muß dann die aminoterminale Dansylaminosäure sein.

Das Peptid U-4-7 mit der Zusammensetzung NPCA-Lys, Glu, Lys, Leu schien nach der Aminosäureanalyse zu urteilen, sauber zu sein. Die Endgruppenbestimmung zeigte aber, daß als aminoterminal Aminosäure neben Lys auch geringe Mengen von NPCALys vorhanden waren. Das bedeutet aber, daß U-4-7 aus dem Peptid Lys⁴, Glu, NPCALys⁶, Leu besteht und durch geringe Mengen von NPCALys⁴, Glu, Lys, Leu verunreinigt ist. Diese Peptide ähneln sich so sehr in ihren Eigenschaften, daß sie mit den angewendeten Methoden nicht getrennt werden konnten.

Das Peptid U-2-2 mit der Aminosäurezusammensetzung Ser, Gly, Leu, Pro, Mod-Lys, His, Arg löste sich nicht in dem Natriumhydrogencarbonatpuffer, in dem die Dansylierung durchgeführt wurde, deswegen konnte die aminoterminal Endgruppe nicht bestimmt werden, aus dem gleichen Grund war auch ein Edmannabbau nicht erfolgreich. Für die Peptide O-4-5-1-a und U-4-1-1 konnten keine aminoterminalen Dansylaminosäuren nachgewiesen werden. Das spricht dafür, daß die aminoterminal Gruppe blockiert ist, was ein guter Hinweis auf Pyrrolidoncarbonsäure als aminoterminal Aminosäure ist. Aminoterminal Glutamin zyklisiert sehr leicht im sauren und schwach alkalischen pH-Bereich zur Pyrrolidoncarbonsäure (das Peptid war mehrfach in Ameisensäure gelöst worden). Für diese beiden Peptide wurden die carboxyterminalen Aminosäuren durch Verdauung mit Carboxypeptidase A bestimmt. Die Carboxypeptidase A^(60,61) spaltet bevorzugt an aromatischen carboxyterminalen Aminosäuren unter Hydrolyse der letzten Peptidbindung und Freisetzung der carboxyterminal Aminosäure.

8.2.0. Carboxyterminale Endgruppen

Es wurde die Bestimmung der carboxyterminalen Endgruppen der Peptide U-4-1-1 und O-4-5-1-a durchgeführt.

Ansatz: 4,6 nMol Peptid wurden in 0,2 ml 0,5 M Morpholinacetatpuffer pH 8,5 mit 1 λ CPA-Suspension 1 1/2 h bei 37°C verdaut und mit 0,02 ml Eisessig abgestoppt.

Von diesem Verdauungsansatz wurde dann die Aminosäureanalyse gemacht. Es wurde in beiden Fällen Tyrosin gefunden, also:

Tabelle 27: Carboxyterminale Endgruppen

Peptid No.	Carboxyterm. AS.
U-4-1-1	Tyr
O-4-5-1-a	Tyr

Die Peptide U-4-1-1 und O-4-5-1-a stammten auf Grund ihrer Aminosäurezusammensetzung von der gleichen Stelle der LDH. Sie unterschieden sich aber dadurch, daß O-4-5-1-a ein modifiziertes Lysin mehr enthielt. Die Folge davon war, daß das letztere bei der Auftrennung mit Hilfe der Gegenstromverteilung in die organische Oberphase ging, während das Peptid U-4-1-1 sich besser in der wäßrigen Unterphase löste. Da die Aminosäuresequenz der Schweineherz LDH in diesem Bereich zur Zeit noch nicht völlig aufgeklärt ist⁽⁶⁴⁾, wurden die restlichen Aminosäuren in den beiden obigen Peptiden auf Grund von Analogiebetrachtungen zur Schweinemuskel LDH und zur Dogfish LDH M_4 zugeordnet.

9.0.0. Thermolysinverdauung eines Peptides

Da das Peptid U-4-1-1 nach der Aminosäureanalyse ein freies und ein modifiziertes Lysin enthielt, stand nicht fest, welches von beiden Lysinen in der Sequenz des Peptides modifiziert war. Es ist bekannt, daß Thermolysin Ile-Val-Bindungen in Peptiden spaltet^(62,63). Deswegen wurde dieses Peptid U-4-1-1 einer thermolysinolytischen Hydrolyse unterworfen.

Die Aminosäuresequenz lautet nach Analogiebetrachtungen:

Gln-Thr-Pro-NPCA-Lys-Ile-Val-Ala-Asx-Lys-Asp-Tyr

Das Thermolysin müßte dann mindestens zwei Peptide freisetzen

Gln-Thr-Pro-NPCALys-(Ile) und (Ile)-Val-Ala-Asx-Lys-Asp-Tyr

Ob die Spaltung zwischen Lys-Ile oder Ile-Val stattfindet, oder an beiden Stellen, muß offen bleiben. Da sich die Peptide Gln-Thr-Pro-NPCA-Lys und Gln-Thr-Pro-NPCA-Lys-Ile sowie Ile-Val-Ala-Asx-Lys-Asp-Tyr und Val-Ala-Asx-Lys-Asp-Tyr aber in ihren chromatographischen und elektrophoretischen Eigenschaften kaum unterscheiden, wurden zwei Peptide erwartet.

Verdauungsansatz:

60 nMol Peptid wurden in 0,1 ml 0,5 M Morpholinacetatpuffer pH 8,5 gelöst und mit $2 \cdot 10^{-3}$ mg Thermolysin 4 Stunden bei 37°C verdaut. Dann wurde mit 20 λ Eisessig abgestoppt.

Die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel mit dem Laufmittel I zeigte folgendes Bild, Abbildung 58)

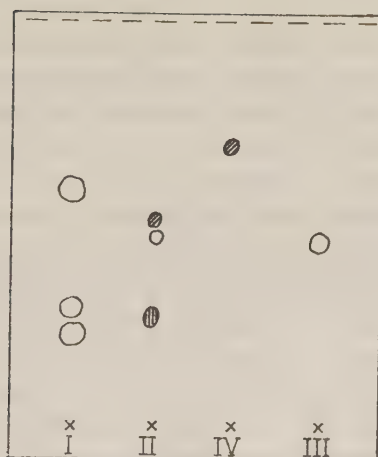


Abb. 58: Dünnschichtchromatographie der thermolysinolytischen Verdauung von U-4-1-1

I: Aminosäurestandard

II: Probe

III: Puffer

IV: NPCA- ϵ -Aminocapronsäure

□ : Ninhydrinfärbg.

▨ : gelb

▤ : Pauly-Anfärbg.

Der ninhydrinpositive violette Fleck aus dem Puffer war ein Zersetzungsprodukt des Morpholins und sollte nicht weiter interessieren.

Das obere Peptid im Chromatogramm zeigte folgende Eigenschaften: Es reagierte nicht mit Ninhydrin, besaß also keine freie Aminogruppe und es war gelb gefärbt, enthielt also das modifizierte Lysin. Das traf für das Peptid Gln-Thr-Pro-NPCALys-Ile zu, denn aminoterminal steht höchstwahrscheinlich eine Pyrrolidoncarbonsäure, (auch mit der Dansylierung konnte keine aminoterminal Aminosäure gefunden werden).

Das untere Peptid im Chromatogramm hatte folgende Eigenschaften:

Es wurde sehr intensiv mit Ninhydrin angefärbt. Es reagierte mit dem Pauly-Reagenz unter grau-brauner Anfärbung, dem Nachweis für Tyrosin. Das traf für das zweite Peptid Val-Ala-Asx-Lys-Asp-Tyr zu.

Elektrophorese des Thermolysinverdaunungsansatzes

Die beiden Peptide wurden im Elektrophoresepuffer I bei pH 6,4 auf Kieselgel elektrophoretisiert. Beide wanderten nicht unter diesen Bedingungen. Das bedeutet, daß im zweiten Peptid ein Asparagin vorliegen muß, die Ladungen sind dann ausgeglichen. Da bei der tryptischen Verdauung nicht carboxyterminal am Lysin⁸² gespalten wurde, muß auf dieses in der Sequenz eine Asparaginsäure folgen.

Damit ist also folgende Stellung des modifizierten Lysins bewiesen:

Gln-Thr-Pro-NPCA-Lys-Ile-Val-Ala-Asn-Lys⁸²-Asp-Tyr

Würde auf das Lysin das Asparagin in der Sequenz folgen, so wäre nicht einzusehen, weswegen das Trypsin am Lysin⁸² nicht gespalten hätte.

10.0.0. Zuordnung der Peptide

Die nach verschiedenen Methoden gereinigten NPCA-Peptide konnten bestimmten Stellen in der Sequenz der Schweineherz LDH, die von der Arbeitsgruppe Kiltz⁽⁶⁴⁾ am hiesigen Institut bestimmt wird, zugeordnet werden. In der folgenden Aufstellung sind die gefundenen Peptide aufgeführt. Die Aminosäuren der Peptide stehen in der Reihenfolge ihrer Sequenz in der LDH.

Für das Peptid U-4-6-2 wies die Elektrophorese auf ein Gln hin, in der Sequenz steht aber an dieser Stelle ein Glu, Kiltz⁽⁶⁴⁾.

Tabelle 28: Zugeordnete Peptide

Peptid No.	Aminosäuresequenz
U-2-1	NPCALys ⁴ -Glu-Lys
O-4-5-2	NPCALys ⁴ -Glu-NPCALys ⁶ -Leu
O-14-8	NPCALys ⁶⁰ -Gly-Glu-Met
U-4-1-1	Gln-Thr-Pro-NPCALys ⁷⁷ -Ile-Val-Ala-Asn-Lys-Asp-Tyr
O-4-5-1-a	Gln-Thr-Pro-NPCALys ⁷⁷ -Ile-Val-Ala-Asn-NPCALys ⁸² - Asp-Tyr
U-4-2-1	Ala-Asn-NPCALys ⁸² -Asp-Tyr
O-7-3-a	NPCALys ¹²¹ -Phe
U-2-2	Ser-Gly-Leu-Pro-NPCALys ¹⁵⁷ -His-Arg
O-12-2	Met-Ala-Glu-NPCALys ¹⁷⁹ -Leu
U-4-6-2	NPCALys ²²⁶ -Glu-Val-His
O-12-3-1	NPCALys ²³⁰ -Met
O-4-3-a	Glu-Val-Ile-NPCALys ²⁴¹ -Leu
M-2-4-2-2	Thr-Ser-Val-Ile-Asn-Glu-NPCALys ³⁰⁶ -Leu-Lys-Asp- Asp-Glu-Val-Ala-Gln-Leu
U-4-1-2	NPCALys ³⁰⁸ -Asp-Asp-Glu-Val-Ala-Gln-Leu
U-4-4	NPCALys ³¹⁶ -Asn
O-12-3-2	NPCALys ³¹⁶ -Asn-Ser-Ala-Asp-Thr-Leu
O-14-3-a	Gly-Ile-Gln-NPCALys ³²⁷ -Asp-Leu
O-7-1	Asp-Leu-NPCALys ³³⁰ -Asp-Leu
O-14-1-a	NPCALys ³³⁰ -Asp-Leu

11.0.0. Abschätzung der Ausbeuten für die Peptide

Es wurden 16 modifizierte Lysine aus der proteolytisch verdauten NPCA-LDH isoliert, da aber ein mittlerer Einbau von 9,4 Resten pro Untereinheit Enzym gemessen wurde, besteht die Frage, inwieweit bestimmte Lysine bevorzugt modifiziert worden sind. Eine Berechnung der Ausbeuten für die einzelnen Peptide am Ende der zahlreichen Isolierungsschritte gibt kein richtiges Bild der Modifizierung einzelner Lysine, denn der Verlust durch Adsorption am Kieselgel und an den Ionenaustauschern sowie beim Lyophilisieren ist für die verschiedenen Peptide unterschiedlich groß. Eine quantitative Bestimmung der verschiedenen Peptide aus einem Fingerprint ist auch nicht möglich, da keine vollständige Auftrennung stattfindet, das beruht auf den geringen Laufstrecken der modifizierten Peptide im Elektrophoreseschritt auf Grund von Adsorption am Träger. Im Chromatographieschritt findet zwar eine gute Auftrennung statt, aber zahlreiche Peptide fallen zusammen, da sie sich in ihren chromatographischen Eigenschaften sehr ähneln.

Eine Quantifizierung der isolierten Peptide scheint mir aber für die Interpretation der Ergebnisse sehr wichtig zu sein. Die NPCA-Peptide haben den großen Vorteil, daß aufgrund des molaren Extinktionskoeffizienten durch eine einfache Messung der Extinktion bei 366 nm die Molarität des Peptides bestimmt werden kann, bis auf zwei Ausnahmen tragen alle Peptide nur eine NPCA-Gruppe. Die molare Konzentration der Summe der jeweiligen NPCA-Peptide in den Vortrennungen wurde durch das Elutions-Volumen und die Extinktion berechnet. Die Art und Weise, wie ich die Mengen der Einzelkomponenten vor einer Trennung abgeschätzt habe, soll ein Beispiel erläutern:

10 μMol einer Mischung aus drei Peptiden wird molekularsiebchromatographisch getrennt und 1 μMol Peptid I, 2,5 μMol Peptid II und 4 μMol Peptid III erhalten. Um eine Aussage über die Anfangskonzentrationen machen zu können, muß ich annehmen, daß der Verlust durch Adsorption am Gel und Verlust

beim Lyophilisieren bei allen Peptiden gleich groß war. Dann ergibt sich für das Beispiel eine Anfangskonzentration von 13,3 % für Peptid I, 33,3 % für Peptid II und 53,4 % für Peptid III.

Zur Proteolyse wurden 5 μ Mol NPCA-LDH eingesetzt. Bei einem Einbau von 9,4 Resten pro Untereinheit ergibt sich eine Konzentration an NPCA-Resten von 47 μ Mol. Nach der Molekularsiebchromatographie auf Sephadex G 25 enthielt die Fraktion M-1 mit dem Ausschlußvolumen der Säule 15 μ Mol NPCA-Reste. Die Fraktion M-2 mit kleineren Peptiden enthielt 20 μ Mol NPCA-Reste und wurde mit Hilfe der Gegenstromverteilung weiter aufgearbeitet.

Die Fraktion M-1 wurde auf einer Sephadex G 50 Säule erneut aufgetrennt und zwei Fraktionen erhalten: M-1' (32 % der aufgegebenen NPCA-Reste) und M-2' (68 % der aufgegebenen NPCA-Reste). Die Fraktion M-1' enthielt etwa 5 μ Mol an NPCA-Resten des Verdauungsansatzes und bestand aus weitgehend unverdaulichem Material oder aus sehr stark aggregierenden Peptiden. Die Fraktion M-2' enthielt etwa 10 μ Mol an NPCA-Resten, in Form von großen Peptiden, die durch eine unvollständige Verdauung entstanden sind. Auch aggregierende kleinere Peptide können ein größeres Molekulargewicht vortäuschen. Diese Fraktion wurde mit SDS und Mercaptoäthanol behandelt und auf Sephadex G 50 rechromatographiert. Bei der Ionenaustauschchromatographie ging der größte Teil dieses Materials verloren, weil auch mit starken Säuren und Basen und unter Zusatz von organischen Lösungsmitteln keine Elution der Peptide mehr erreicht werden konnte. Nur das Peptid M-2-4-2-2 konnte soweit gereinigt werden, daß eine Identifizierung möglich war, die Löslichkeit dieses Peptides mit 16 Aminosäuren beruhte auf dem freien Lysin, der Glutaminsäure und den beiden Asparaginsäuren.

Die Gegenstromverteilung lieferte die Fraktionen s. Tab. 29. Eine Bestimmung der Ausbeuten für die Fraktionen wurde aus dem Elutionsdiagramm für die Extinktion bei 366 nm durchgeführt.

Tabelle 29: Ausbeuten für die Fraktionen

Fraktion der Gegenstromvert.	Gehalt an NPCA-Peptid	Zusammensetzung aus den Peptiden:
U-2	2,0 µMol	U-2-1, U-2-2
U-4	2,6 µMol	U-4-1-1, U-4-1-2 U-4-2-1, U-4-4-1, U-4-6-1, U-4-7-1
O-13,14	2,2 µMol	O-14-1, O-14-3, O-14-8
O-12	0,8 µMol	O-12-2, O-12-3-1, O-12-3-2
O-10,11	0,9 µMol	(O-7-3)
O-6,7,8,9	3,6 µMol	O-7-1, O-7-3
O-3,4,5	5,3 µMol	O-4-3-1, O-4-5-1-a, O-4-5-2

Die Anteile der verschiedenen Peptide in den einzelnen Fraktionen der Gegenstromverteilung wurden aus dem Elutionsdiagramm der sich daran anschließenden Ionenaustauschchromatographie oder den Ausbeuten der Peptide nach der Dünnschichtchromatographie zurückgerechnet. Das ist in diesem Fall sinnvoll, da die Peptide in ihrer Löslichkeit sehr ähnlich sind. Die Ausbeuten an Peptiden geben den Anteil der Lysine an, die modifiziert wurden. Allerdings gilt die Einschränkung, daß nur die Lysine erfaßt wurden, die in der Proteolyse der NPCA-LDH kleinere Peptide ergaben.

Tabelle 30: Modifizierungsgrad der Lysine

Peptide	Ausbeute an Peptiden, zurückgerechnet auf Gegenstromverteilg.	No. der Lysine	Modifizierungs- grad der Lysine
U-2-1	40 %	Lys ⁴	55 %
O-4-5-2	15 %	"	
O-4-5-2	15 %	Lys ⁶	20 %
U-4-7	5 %	"	
O-4-5-1-1	15 %	Lys ⁷⁷	30 %
U-4-1-1	15 %	"	
O-4-5-1-a	15 %	Lys ⁸²	20 %
U-4-2-1	5 %	"	
O-7-3-1	50 %	Lys ¹²¹	50 %
O-4-3-1	40 %	Lys ²⁴¹	40 %
O-14-3	20 %	Lys ³²⁷	20 %
O-7-1	25 %	Lys ³³⁰	35 %
O-14-1	10 %	"	
O-14-8	10 %	Lys ⁶⁰	10 %
U-4-6-2	5 %	Lys ²²⁶	5 %
U-4-1-2	5 %	Lys ³⁰⁸	5 %
O-12-3-2	5 %	Lys ³¹⁶	10 %
U-4-4-1	5 %	"	
M-2-4-2-2	5 %*	Lys ³⁰⁶	5 %*
U-2-2	< 5 %	Lys ¹⁵⁷	< 5 %
O-12-2	< 5 %	Lys ¹⁷⁹	< 5 %
O-12-3-1	< 5 %	Lys ²³⁰	< 5 %

* Eine Bestimmung der Konzentration für das Peptid M-2-4-2-2 war nicht möglich, da es nicht über die Gegenstromverteilung gereinigt worden war. Eine Abschätzung der Anfangskonzentration wurde durch Vergleich der Endwerte für das ähnlich gebaute O-4-5-1-a durchgeführt.

An der Peptidausbeute, die den Modifizierungsgrad der Lysine wiedergibt, lassen sich die Lysine in drei Gruppen einteilen:

1) Lysine mit einem Modifizierungsgrad von 20 bis 50 %.

Das sind die 8 Lysine: Lys⁴, Lys⁶, Lys⁷⁷, Lys⁸², Lys¹²¹, Lys²⁴¹, Lys³²⁷, Lys³³⁰.

Diese Lysine liegen im Modell der Dornhai LDH H₄, die große Ähnlichkeit mit der Struktur der Schweineherz LDH hat, alle sehr exponiert an der Oberfläche.⁽⁷⁴⁾ Die einzige Ausnahme ist das Lysin 241 in der Nähe des aktiven Zentrums. Nach der Struktur-Sequenz Korrelation für diesen Bereich, die ich so durchführte, daß ich das entsprechende von der Arbeitsgruppe Kiltz sequenzierte Peptid in das Modell der Dornhai LDH einpaßte, die nach den Beugungsdaten im Backbone mit der Schweineherz LDH übereinstimmt, ergibt sich keine exponierte Stellung des Lys²⁴¹. Eine Verschiebung der Sequenz um eine Aminosäure in Richtung zum Carboxylterminus würde das Lys²⁴¹ in eine sehr exponierte Stellung an der Außenseite der dort vorliegenden Helix bringen und außerdem mit der von Rossmann geforderten Stellung des Tryptophans als 249 Aminosäure in der Struktur übereinstimmen. In der jetzigen Anordnung steht das Trp an Stelle 248.

2) Lysine mit einem Modifizierungsgrad von 5 bis 10 %

Das sind die 5 Lysine Lys⁶⁰, Lys²²⁶, Lys³⁰⁶, Lys³⁰⁸, Lys³¹⁰

Diese Lysine liegen ebenfalls an der Oberfläche, aber nicht so exponiert wie die anderen, entweder in Bereichen, in denen die Untereinheiten zusammenstoßen oder in Vertiefungen an der Proteinoberfläche.

3) Lysine mit einem Modifizierungsgrad unter 5 %.

Das sind die 3 Lysine Lys¹⁵⁷, Lys¹⁷⁹, Lys²³⁰.

Lys¹⁷⁹ und Lys²³⁰ liegen in Vertiefungen der Oberfläche der LDH, aber immer noch in Bereichen, die von der Oberfläche her zugänglich sind, weil die Struktur in diesen Gebieten sehr aufgelockert ist. Lys¹⁵⁷ liegt in dem Bereich, in dem der Arm der benachbarten Untereinheit gebunden wird.

Die völlig fehlende Markierung von solchen Lysinen, die von den Untereinheiten abgedeckt werden und erst nach einer Denaturierung des Enzyms an die Oberfläche kommen und so modifiziert werden können, ist ein wichtiges Indiz für eine native modifizierte LDH. Wir erhalten ein weitgehend richtiges Bild von der Oberfläche der modifizierten LDH, wenn wir unter Berücksichtigung eines mittleren Einbaus von 9,4 Resten pro Untereinheit annehmen, daß 8 Lysine weitgehend modifiziert vorliegen und weitere 4 Lysine viel geringer modifiziert sind. Dagegen werden die drei etwas verdeckten Lysine nur einen unwesentlichen Einfluß auf den Gesamteinbau haben.

11.1.0. Die modifizierte Oberfläche

Aus Röntgenstrukturdaten kennt man den Durchmesser der tetrameren Einheit der LDH, das sind 84 Å. Damit errechnet sich die Oberfläche zu 22200 Å². Die an die Oberfläche der LDH gebundenen NPCA-Reste werden aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Protein eher an das Protein adsorbiert sein, als in die Lösung ragen. Jeder NPCA-Rest besitzt etwa eine Fläche von 63 Å². Bei 38 NPCA-Resten im Tetrameren (9,4 pro UE) bedecken die NPCA-Reste zusammen rund 2400 Å², das sind ca. 11 % der Oberfläche der LDH.

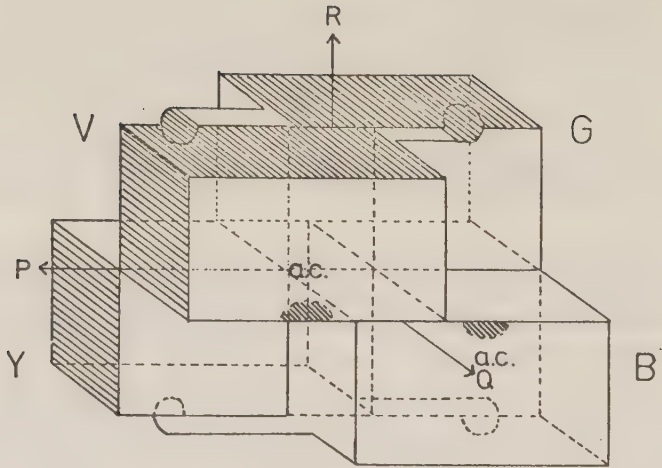


Abb. 59: Quartärstruktur der LDH

a.c.: Aktives Zentrum

▨: modifizierte Oberfläche

Nur die Bereiche, die bei einer P-R-Projektion des Moleküls in die Papierebene fallen, sind nicht modifiziert, bis auf die Lysine 230 und 241. In diesem nicht modifizierten Bereich befinden sich Coenzymbindungsstelle und aktives Zentrum. Die modifizierten Bereiche ziehen sich also wie ein Ring um das Molekül und lassen das aktive Zentrum frei.

12.0.0. Stellung der Lysine in der Quartärstruktur der LDH

Es ist ein Grundprinzip in der Struktur eines globulären Proteins, daß die hydrophoben Aminosäurereste weitgehend im Innern des Proteins liegen, dagegen die polaren Reste außen liegen. Das ist auch bei der LDH der Fall, so liegen z.B. von den 30 Lysinen der Dornhai LDH M_4 28 an der Oberfläche⁽⁷⁴⁾. Das Innere des Proteins ist also eine kompakte, hydrophobe Struktur. Die polaren, geladenen Reste an der Außenseite des Proteins ermöglichen eine Wechselwirkung mit dem Wasser und halten das Protein in Lösung.

Für alle Betrachtungen, die ich bezüglich der Struktur der LDH anstelle, muß ich mich auf die Dornhai LDH beziehen. Von diesem Enzym wurde nach den Daten von Rossmann⁽⁴⁴⁾ (Röntgenstrukturanalyse für 2,8 Å) von Krönke⁽⁷⁴⁾ am hiesigen Institut ein Modell gebaut. Da aber bekannt ist, daß die Sequenz der Isoenzyme aus verschiedenen Spezies übereinstimmt bzw. sehr ähnlich ist^(2,45), habe ich als Arbeitshypothese angenommen, daß die Struktur der Schweine LDHH $_4$, mit der ich arbeite, wie die Dornhai LDHM $_4$ aufgebaut ist.

Betrachtet man die Struktur der LDH in Lösung, so muß man seine Anordnung als Tetrameres berücksichtigen. Von jeder Untereinheit steht 50 % der Oberfläche in engem Kontakt mit den drei übrigen Untereinheiten. Außerdem werden weitere Bezirke noch durch den "Arm" der benachbarten Untereinheit abgedeckt. Nur ein Teil der Bezirke, die in dem Modell der LDH-Untereinheit an der Oberfläche liegen, befinden sich auch in der nativen tetrameren Struktur der LDH an der Oberfläche. Das bedeutet aber, daß von den 24 Lysinen⁽⁴⁵⁾ der Schweine LDHH $_4$, (die wohl genauso aufgebaut ist) ein Teil der Lysine gar nicht modifiziert werden kann, solange die LDH als Tetrameres vorliegt. Kann man nachweisen, daß man nur Lysine modifiziert hat, die im Tetrameren freiliegen, so ist das ein guter Hinweis dafür, daß sich die native Struktur des Enzyms durch die Modifizierung nicht geändert hat.

Von den 24 Lysinen der Schweineherz LDH sind bislang 20 Lysine in der Sequenz zugeordnet worden. Zwei weitere noch nicht zugeordnete Lysine konnte ich als NPCA-Lysinpeptide isolieren und aufgrund von Analogiebetrachtungen zur Schweine M_4 LDH und Dornhai M_4 LDH zuordnen. Von diesen 22 Lysinen liegen 15 im Tetrameren an der Oberfläche.

Tabelle 31: Stellung der Lysine bei der LDH

Lysine der Dornhai LDH M_4	Lysine der Schweine LDH H_4	Lysine, die im Tetrameren außen liegen	Lysine, die in vorliegender An- ordnung modifiziert wurden
4	4	4	4
6	6	6	6
-	43	-	-
58	58	-	-
60	60	60	60
77	77	77	77
82	82	82	82
92	91	-	-
120	121	121	121
-	151	151	-
-	157	(157)	157
-	179	(179)	179
226	226	226	226
-	230	(230)	230
-	241	241	241
-	243	-	-
263	263	-	-
306	305	305	305
308	307	307	307
317	316	316	316
327	327	327	327
330	330	330	330

Die freien Lysine auf der Oberfläche der Quartärstruktur liegen zum Teil sehr dicht beieinander.

Tab. 32: Abstand der Lysine

No. der Lysine in der Sequenz	Abstand beim Modell der Dornhai LDH nach Rossmann
----------------------------------	--

60 und 83	5 Å
121 " 330	4 Å
306 " 308	10 Å
227 " 230	10 Å
179 " 227	10 Å

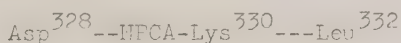
Das Modifizierungsreagenz selbst hat eine Länge von 15 Å. Man kann annehmen, daß es sich aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen an die Proteinoberfläche anlegt und nicht in das Lösungsmittel hineinragt. Es gibt dann 4 bis 5 Lysine, bei denen eine Modifizierung gleichzeitig ein zweites Lysin abdecken würde. Somit erscheint ein Einbau von nur 9,4 Amidinogruppen pro UE plausibel.

Auch die statistische Verteilung der Modifizierung der Schweineherz LDH kann so erklärt werden. Denn in einem Fall kann zunächst nur das eine von zwei benachbarten Lysinen blockiert werden, in einem anderen Fall wird zunächst das zweite Lysin modifiziert. Für diese These der gegenseitigen Abdeckung der Lysine spricht, daß ich zwar das Peptid



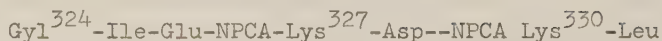
gefunden habe, aber nicht ein entsprechendes Peptid mit beiden modifizierten Lysinen.

Desgleichen isolierte ich das Peptid



weil carboxyterminal zum Lys³²⁷ gespalten worden war.

Aber ein Peptid der Struktur:



konnte ich nicht isolieren und daraus schließe ich, daß die Modifizierung beider Lysine durch die Größe des NPCA-Restes aus sterischen Gründen nicht möglich ist. Dagegen liegen die Lysine 4 und 6 sowie 77 und 82 so weit auseinander, daß beide modifiziert werden können, die entsprechenden Peptide konnte ich isolieren.

Von den an der Oberfläche des Tetrameren liegenden Lysinen wurden 13 modifiziert, wie in Tabelle 31 angegeben. Drei weitere: Lys 157, Lys 179 und Lys 230, die bei dem Dornhai LDH₄-Modell nicht exponiert an der Oberfläche liegen, habe ich in U-2-2, O-12-2 und O-12-3-1 gefunden. Sie liegen in Bereichen, in denen die Dornhai-LDH-Sequenz nicht mit der Schweine-LDH-Sequenz übereinstimmt. Überträgt man die Schweineherz-LDH-Sequenz trotzdem auf die Dornhai-LDH-Struktur, so müßten die Lysine 157, 179, 230 in Bereichen liegen, die zwar nicht völlig an der Oberfläche liegen, die aber aufgrund der aufgelockerten Struktur an diesen Stellen noch durch das Reagenz erreichbar wären. Das NPCA-Lysin 241 läge dann nur in einer Entfernung von 10 bis 15 Å vom aktiven Zentrum entfernt. In wie weit diese Zuordnung stimmt, wird die hochaufgelöste Röntgenstrukturanalyse der Schweineherz LDH zeigen. Ein Lysin, Lys 151, das an der Oberfläche liegen sollte, konnte ich nicht als NPCA-Lysinpeptid finden. Das könnte auf einer von der Dornhai LDH abweichenden Faltung der Peptidkette bei der Schweineherz LDH beruhen, so daß das Lys 151 nicht mehr zugänglich wäre. Es ist auch möglich, daß ich ein Peptid, es könnte die Zusammensetzung Val, Ala, Trp, NPCA-Lys haben, nicht isolieren konnte, weil es wegen seiner hydrophoben Aminosäurezusammensetzung an den Ionenaustauschern adsorbiert blieb.

13.0.0. Stereoaufnahmen vom Modell der LDH

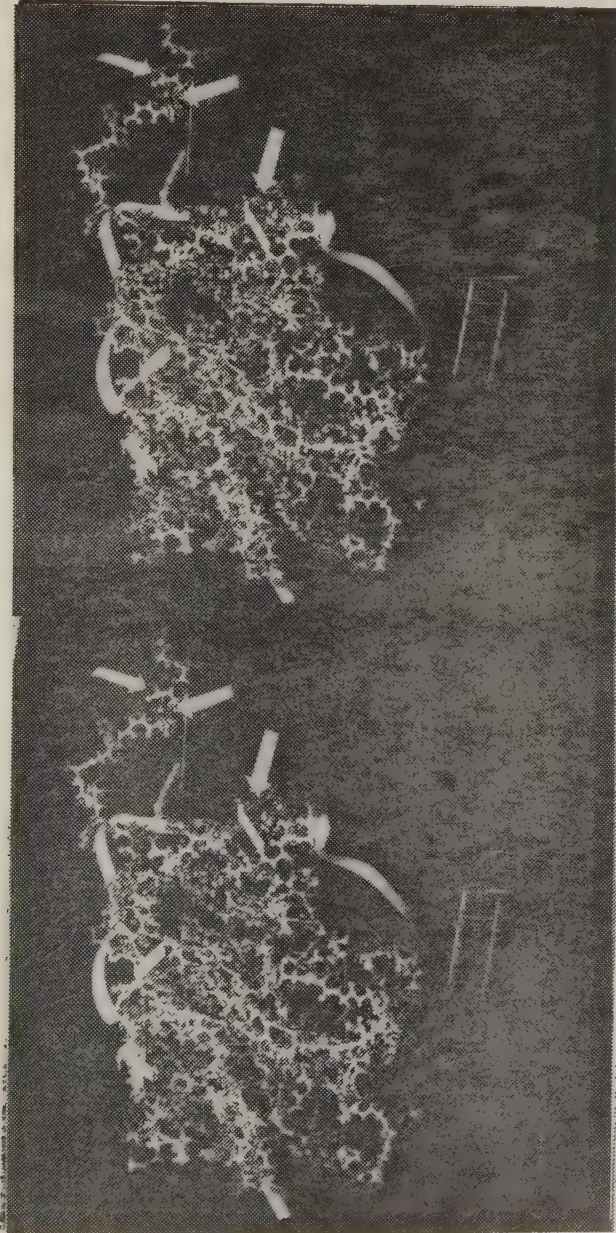


Abb. 60: Untereinheit V aus der tetrameren Struktur der LDH von Abb. 59, dargestellt im Modell der Dornhai-M₄ LDH. Blick in Richtung Q-Achse auf die P-R-Ebene. Die weißen Pfeile geben die modifizierten Lysine an.

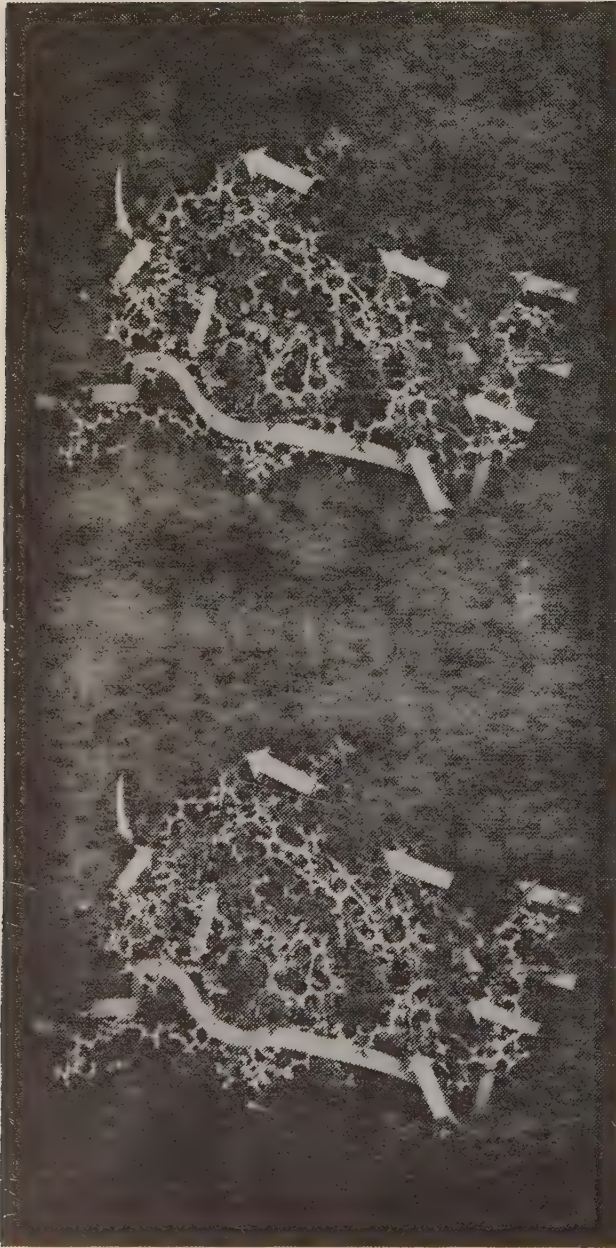


Abb. 61: Untereinheit V aus der tetrameren Struktur der LDH von Abb. 59, dargestellt im Modell der Dornhai- M_4 LDH. Blick in Richtung P-Achse auf die Q-R-Ebene. Die weißen Pfeile geben die modifizierten Lysine an.

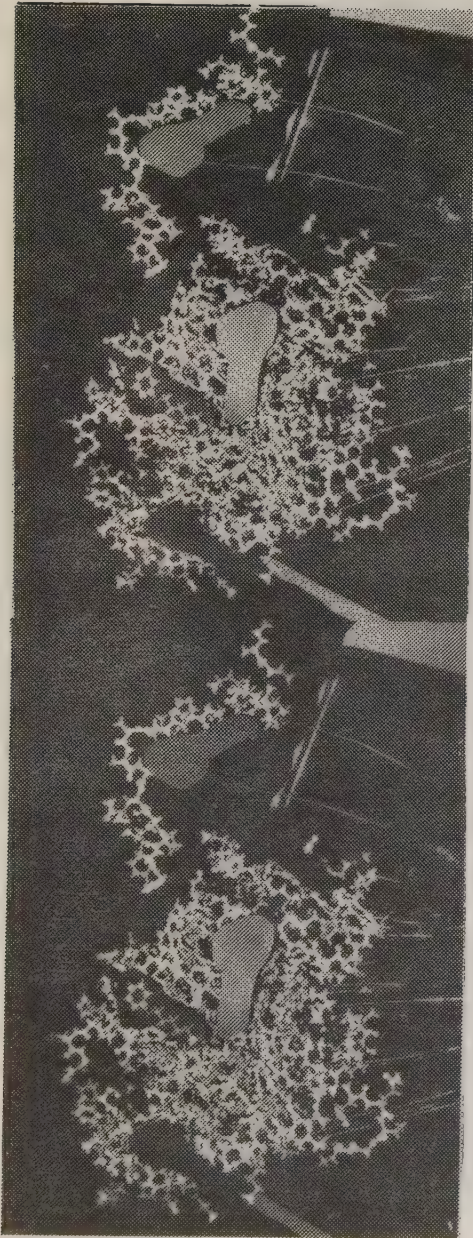


Abb.62: Blick in Richtung R-Achse auf die P-Q-Ebene

Dargestellt ist eine Untereinheit der LDH mit 9 NPCA-Resten, die nach der Ausbeute der isolierten Peptide den größten Anteil an der Modifizierung hatten. Die grauen Blättchen geben die Stellung der NPCA-Reste an. Das Lysin²⁴¹ ist in dieser Darstellung nicht mit einem NPCA-Rest versehen, da es bei der Dornhai-H₄ LDH nicht existiert und seine exakte Stellung durch Röntgenstrukturanalyse noch nicht feststeht. Betrachtet man die modifizierte Quartärstruktur, so sieht man, was bei der Untereinheit erst angedeutet ist, daß sich die modifizierten Bereiche fast wie ein Ring um das Tetramere ziehen, nur das Lysin 241 liegt in der Nähe des aktiven Zentrums.

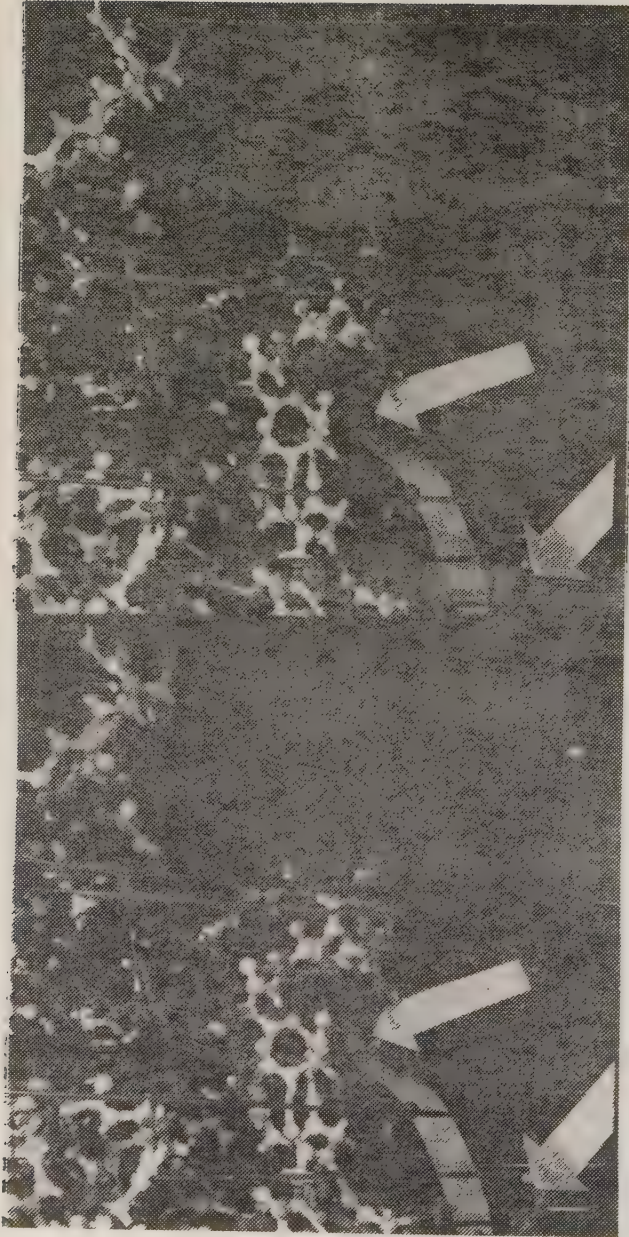


Abb. 63: Blick aus einem Winkel zwischen P- und Q-Achse auf das aktive Zentrum der Untereinheit V aus Abb. 59. In das Modell der Dornhai- M_4 LDH wurde die Sequenz 235 bis 250 nach den neuen Daten von Kiltz⁽⁶⁴⁾ et al. eingebaut. In der Mitte des Bildes das Lysin 241.

Teil IV Ergebnisse und Diskussion

1.0.0. Ergebnisse

Die vielen Fakten über die amidinierte LDH wurden abschließend zusammengefaßt, damit man sich ein Bild über die Eigenschaften der NPCA-LDH machen kann.

1.1.0. Übersicht über die Ergebnisse

- A) a) Die Bedingungen für eine optimale Modifizierung der Schweineherz LDH mit dem Imidoester NPCI wurden ausgearbeitet.
- b) Nach Anreicherung von hochmodifiziertem Enzym und Abtrennung von denaturierter LDH wurde eine NPCA-LDH H_4 mit 9,4 NPCA-Resten pro UE und einer Restaktivität von 42 % bezogen auf die unmodifizierte LDH erhalten.
- c) Die Modifizierung des ternären LDH-NAD⁺-Sulfit Komplexes führte zu einem geringeren Einbau von mindestens einem NPCA-Rest, ohne daß das Enzym vor einem Aktivitätsverlust geschützt werden konnte.
- B) Untersuchungen über das Verhalten der NPCA-LDH
- a) Einheitlichkeit der NPCA-LDH
- 1) Die Niederspannungselektrophorese auf Acetatfolien ergab ein einheitliches Bild.
 - 2) Die Molekularsiebchromatographie auf Seph. G 200 f zeigte das gleiche Molekulargewicht wie unmodifizierte LDH.
- b) Löslichkeit und Stabilität der NPCA-LDH
- Die NPCA-LDH ist nur in Glycinpuffer löslich. Sie ist nur bei Zusatz von NAD⁺ und Sulfit stabil.
- c) Kinetische Untersuchungen
- Die Michaeliskonstanten sind unverändert. $V_{\max}$ ist kleiner als bei unmod. LDH. Das pH-Optimum hat sich nicht verschoben.

d) Weitere Untersuchungen an der NPCA-LDH

- 1) Das ORD-Spektrum ist unverändert.
- 2) Die Hitzestabilität beträgt nur noch 10 % der unmod. LDH.
- 3) Die Zahl der reaktiven SH-Gruppen ist nur unwesentlich erhöht.
- 4) NPCA-LDH wird wesentlich langsamer durch Trypsin verdaut, was logisch ist, da leicht zugängliche Lysinreste amidiniert worden sind.

e) Tryptische Verdauung der NPCA-LDH

- 1) Die schonende Verdauung der NPCA-LDH mit hochgereinigtem Trypsin führte zu einer angedauten NPCA-LDH (ang.-NPCA-LDH)
- 2) Charakterisierung der ang.-NPCA-LDH
Sie ist nur noch in Glycinpuffer bei Zusatz von DMSO löslich. Die SDS-Diskelektrophorese zeigte gleiches MG für die Untereinheit wie NPCA-LDH. Die ang.-NPCA-LDH hat Enzymaktivität und zeigt 75 % der Beweglichkeit von NPCA-LDH auf der Acetatfolie bei Niederspannungselektrophorese. Die thermische Stabilität bei 55°C beträgt nur noch 20 % von der NPCA-LDH.

c) Untersuchungen über die Angriffspunkte des Imidoesters am Protein.

- a) Es war keine Beeinträchtigung der SH-Gruppen zu beobachten.
- b) Noch vollständiger Hydrolyse mit Proteasen sowie mit HCl wurde nur NPCA-Lysin gefunden.
- c) Isolierung und Identifizierung der modifizierten Peptide:
20 NPCA-Lysin haltige Peptide wurden zugeordnet. Diese Peptide enthielten 16 verschiedene Lysine, die somit alle an der Oberfläche der Quartärstruktur liegen. Die Peptide wurden aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung und ihrer Aminosäureendgruppen nach der bereits vorliegenden Sequenz der Schweineherz LDH identifiziert und zugeordnet.

1.2.0. Übersicht über die gefundenen NPCA-Peptide

NPCALys⁴-Glu-Lys

NPCALys⁴-Glu-NPCALys⁶-Leu

NPCALys⁶⁰-Gly-Glu-Met

Gln-Thr-Pro-NPCALys⁷⁷-Ile-Val-Ala-Asn-Lys-Asp-Tyr

Gln-Thr-Pro-NPCALys⁷⁷-Ile-Val-Ala-Asn-NPCALys⁸²-Asp-Tyr

Ala-Asn-NPCALys⁸²-Asp-Tyr

NPCALys¹²¹-Phe

Ser-Gly-Leu-Pro-NPCALys¹⁵⁷-His-Arg

Met-Ala-Glu-NPCALys¹⁷⁹-Leu

NPCALys²²⁶-Glu-Val-His

NPCALys²³⁰-Met

Glu-Val-Ile-NPCALys²⁴¹-Leu

Thr-Ser-Val-Ile-Asn-Glu-NPCALys³⁰⁶-Leu-Lys-Asp-Asp-Glu-Val-Ala-Gln-L

NPCALys³⁰⁸-Asp-Asp-Glu-Val-Ala-Gln-L

NPCALys³¹⁶-Asn-Ser-Ala-Asp-Thr-Leu

NPCALys³¹⁶-Asn

Gly-Ile-Gln-NPCALys³²⁷-Asp-Leu

Asp-Leu-NPCALys³³⁰-Asp-Leu

NPCALys³³⁰-Asp-Leu

Für die unterstrichenen Aminosäuren wurden Endgruppenbestimmungen durchgeführt.

2.0.0. Diskussion

Die von mir isolierten Peptide zeigen, daß 16 Lysine in der Tetramerstruktur der LDH freiliegen. Bei einem Einbau von 9,4 NPCA-Resten pro UE Enzym bedeutet dies, daß die LDH statistisch modifiziert worden ist. Im Durchschnitt wurden also 60 % aller an der Oberfläche liegenden Lysine modifiziert. Es wurden außerdem nur Lysine modifiziert, die in der Quartärstruktur der LDH an der Oberfläche liegen. Die meisten Lysine liegen sehr exponiert an der Oberfläche, nur bei wenigen gibt es noch kleinere Schwierigkeiten mit dem genauen Verlauf der Peptidkette im Modell, weil dort die Schweineherz-LDH-Sequenz nicht mit der Sequenz der Dornhai LDH übereinstimmt.

2.1.0. Ein Lysin am aktiven Zentrum?

Das entscheidende Argument für ein Lysin in unmittelbarer Umgebung des aktiven Zentrums war die Isolierung eines Peptides mit der Zusammensetzung Glu,Val,Ile,NPCA-Lys,Leu. Die aminoterminal Aminosäure wurde als Glu bestimmt und da chymotryptisch verdaut worden war, muß Leu carboxyterminal stehen. Die Zunahme der Ile- und Val-Werte von je 0,4 bei 24 stündiger Hydrolyse auf 0,7 bzw. 1 Aminosäurerest im Peptid bei 72-stündiger Hydrolyse weist auf eine Ile-Val Bindung hin. Das gefundene Peptid ist ein Teil jener von Jeckel und Kiltz⁽⁹⁵⁾ gefundenen Sequenz, in der sich das mit Diazobenzol fonsr. modifizierbare Tyrosin befindet, das als essentiell für die LDH gilt.

Tyr-Peptid:

Met-Val-Val-Glu-Ser-Ala-Tyr²³⁷-Glu-Val-Ile-Lys

NPCA-Lys-Peptid:

Glu-Val-Ile-NPCALys-Leu

Nach Rossmann⁽⁹⁶⁾ steht das essentielle Tyrosin in der Sequenz der Schweineherz LDH als Aminosäure 237 in seinem Modell, wie es die noch nicht völlig fertiggestellte Röntgenstrukturanalyse für höhere Auflösung zeigt. Dann muß das folgende Lysin die 241. Aminosäure in der Sequenz sein und in etwa gleicher Stellung wie die 241. Aminosäure im Modell der Dornhai LDH stehen. Dieses Lysin würde dann nur in einer Entfernung von etwa 10 Å vom aktiven Zentrum entfernt stehen.

Da die Faltung der Peptidkette in diesem Bereich für die Schweineherz LDH aber noch nicht von Rossmann mit höherer Auflösung bestimmt wurde (das Tyrosin konnte er wegen dessen hoher Elektronendichte leichter ausmachen), läßt sich noch nicht genau angeben, ob das von mir modifizierte Lysin 241 sehr exponiert an der Oberfläche steht, oder ob es durch die an dieser Stelle vorliegende α -Helix etwas abgeschirmt ist.

Der Aktivitätsverlust durch die Modifizierung und der kleinere $V_{\max}$ -Wert könnten somit durch eine Deformation des aktiven Zentrums erklärt werden. Dieses Lysin scheint, wie die Versuche zeigten, aber im ternären LDH-NAD⁺-Sulfit-Komplex nicht abgedeckt zu werden, denn der Aktivitätsverlust trat auch bei Modifizierung in Anwesenheit von NAD⁺-Sulfit ein. Auch die Tatsache, daß die NPCA-LDH nur durch Stabilisierung mit $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ NAD⁺ und 10^{-4}M Sulfit vor Denaturierung geschützt werden kann, ist ein eindeutiger Beweis dafür, daß sich der ternäre Komplex ausbilden kann und somit auch im aktiven Zentrum selbst kein NPCA-Rest stehen kann.

2.2.0. Ursache des Aktivitätsverlustes bei Amidinierung

Interessant ist die Beobachtung, daß der bei der Modifizierung der LDH auftretende Aktivitätsverlust von der Größe des Substituenten am Lysin abhängig ist. Der kleine Acetylrest verursacht keinen Aktivitätsverlust. Der NPCA-Rest ist durch einen Spacer ziemlich flexibel und hat an seiner Bindungsstelle zum Lysin einen geringen Platzbedarf, die Folge ist,

daß die Enzymaktivität nach Modifizierung mit diesem Rest auf die Hälfte zurückgeht. Der Pyridoxalphosphatrest ist dagegen sehr sperrig, weil er direkt an das Protein gebunden wird, außerdem kann die Phosphatgruppe des Pyridoxalphosphats eine abstoßende Kraft auf saure Aminosäurereste in unmittelbarer Umgebung ausüben, dadurch verliert das Enzym bei Modifizierung mit diesem Rest seine Aktivität. Der ternäre Komplex LDH-NAD⁺-Sulfit wird nicht mit Pyridoxalphosphat unter Aktivitätsverlust modifiziert. Das ist verständlich, wenn man berücksichtigt, daß das diskutierte Lysin in der Nähe des aktiven Zentrums liegt, so daß durch Strukturänderungen in ternären Komplex der sperrige Pyridoxalphosphatrest nicht mehr angreifen kann. Im ternären Komplex kann dieses Lysin durch den kleinen Acetylrest erreicht werden. Die Imidoestergruppierung ist auch nicht viel voluminöser und aufgrund des Spacers wird der Dinitroaromat gar nicht so dicht an die Proteinoberfläche herangeführt.

Die bei der Acetylierung gefundenen drei im ternären Komplex der LDH abgedeckten Lysine, sowie die ein oder zwei Lysine, die bei der Amidinierung in Anwesenheit von NAD⁺/Sulfit wenig modifiziert wurden, können andere Lysine sein. Da bekannt ist, daß im ternären Komplex eine Veränderung der Struktur der LDH stattfindet, können im ternären Komplex auch die Lysine 179 und 230 abgedeckt werden, denn die Lysine 179 und 230 liegen zwar in Bereichen der Struktur, die von außen zugänglich, aber von Peptidketten umgeben sind.

Völlig offen ist nach wie vor, ob die gefundenen 42 % Restaktivität nach Modifizierung eine einheitliche Form von modifizierter LDH repräsentieren, oder ob verschiedene Spezies unterschiedlich modifizierter LDH vorliegen und die 42 % Restaktivität nur einen Mittelwert angeben. Die Versuche zur Thermostabilität der modifizierten LDH zeigten durch einen biphasischen Aktivitätsverlauf, daß mindestens zwei Formen modifizierter LDH mit unterschiedlicher Thermostabilität vorliegen.

Der Aktivitätsverlust kann nicht auf eine Nebenreaktion des Imidoesters mit der essentiellen SH-Gruppe des Enzyms oder anderen essentiellen Aminosäuren zurückgeführt werden. Auch Konformationsänderungen nach Modifizierung scheiden zur Erklärung des Aktivitätsverlustes aus, wie ORD-Messungen und die Bestimmung des Stokes-Radius des modifizierten Proteins zeigten. Die unveränderten Michaeliskonstanten geben an, daß die Bindung im ternären Komplex nicht beeinflußt ist. Die Pyridoxalphosphatmodifizierte LDH zeigte ebenfalls eine unveränderte K_m ⁽⁸⁷⁾. Die Maximalgeschwindigkeit war bei der Amidinierung auf etwa die Hälfte zurückgegangen, bei der Pyridoxalphosphatmodifizierung war V_{max} noch stärker verringert⁽⁸⁷⁾.

Ich meine, daß der Aktivitätsverlust nach Modifizierung der LDH mit NPCI zu einem großen Teil auf der Modifizierung des Lysin 241 beruht, das in unmittelbarer Nähe des Tyrosin 237 steht. Eine wichtige Funktion des Lysins 241 für den katalytischen Prozeß möchte ich ausschließen, da die Acetylierung mit dem Abbau der Ladung keinen Aktivitätsverlust des Enzyms zur Folge hatte.

2.3.0. Probleme hydrophober Modifizierung

In der vorliegenden Dissertation konnte ich zeigen, daß eine Modifizierung eines Enzyms unter Einführung von sehr hydrophoben Resten möglich ist. Die modifizierte LDH hatte eine Restaktivität von 42 % bei einem Einbau von 38 Amidinoresten pro tetrameres Enzym. Diese Amidinoreste trugen einen Dinitroaromaten, der über einen Spacer an die Lysine gebunden war. Die langwierigen Versuche, die nötig waren, um mit einem wasserunlöslichen Reagenz einen derartig hohen Einbau zu erzielen, zeigten, daß eine Modifizierung unter diesen Voraussetzungen nur möglich ist, wenn in Gegenwart eines organischen Lösungsmittels bei tiefer Temperatur gearbeitet wird. Ein derartig hydrophob substituiertes Enzym ist nur in Gegenwart bestimmter, besonders gut solvatisierender Pufferionen löslich.

Die Stabilität dieses modifizierten Enzyms ist gering. Eine Handhabung ist nur in Gegenwart von Schutzfaktoren (NAD^+ /Sulfit), die die native Struktur stabilisieren, möglich.

Ich meine, man kann die an der modifizierten LDH gewonnenen Erkenntnisse verallgemeinern und behaupten, daß ein hydrophob modifiziertes Enzym, dessen essentielle Aminosäurereste unverändert sind, seine Aktivität beibehält, sei es in Lösung oder in Suspension. Ein partieller Aktivitätsverlust des modifizierten Enzyms kann auf einer Deformation des aktiven Zentrums durch die eingeführten Reste beruhen, wenn diese die Oberflächenstruktur in einer gewissen Entfernung vom aktiven Zentrum verändern.

Die Handhabung eines derartig hydrophob modifizierten Enzyms ist völlig abhängig von den Möglichkeiten der Löslichkeit und Stabilisierung dieses Enzyms. Ich mußte feststellen, daß die Zugabe von organischen Lösungsmitteln keine erhöhte Löslichkeit der modifizierten LDH brachte, sondern im Gegenteil eine Fällung oder Denaturierung des Enzyms zur Folge hatte. Daraus kann man schließen, daß die polaren Aminosäurereste in der Wechselwirkung mit der Hydrathülle des Wassers und mit Gegenionen essentiell für die Löslichkeit und Stabilität des Proteins sind. Eine Löslichkeit bzw. Stabilisierung des Proteins über hydrophobe Wechselwirkung von hydrophoben Aminosäureresten mit unpolaren Lösungsmitteln war nicht zu erzielen.

Teil V Material und Methoden

Reagentien

Trypsin, α -Chymotrypsin, Carboxypeptidase A und B wurden von der Firma Worthington Bioch. Corp. bezogen, NAD^+ , NADH und Schweine- H_4 LDH von Boehringer, Mannheim, Subtilisin von Novo Industri A/S, Pronase E, Proteinase K, Aminopeptidase K und Thermolysin von Merck. Beschichtete Dünnschichtplatten SIL G 25 sowie Celluloseacetat-Folien stammten von Machrey & Nagel, polyacrylamidbeschichtete Dünnschichtfolien F 1700 von Schleicher und Schüll. 5-5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) wurde von EGA Chemie Steinheim bezogen, MTT, Ninhydrin und Dansylchlorid von Serva, Heidelberg, PMS von Aldrich, Europe und Dansylaminosäuren von BDH Biochemicals. Ameisensäure, Eisessig und Salzsäure waren Baker p.A. Reagentien, n-Propylalkohol, N-Äthylmorpholin, ebenfalls p.A. stammten von Fluka. Alle übrigen nicht genannten Reagentien waren von Merck.

Herrn Dr. Jany danke ich dafür, daß er mir hochgereinigtes Trypsin zur Verfügung stellte.

Synthese von ϵ -Aminocaprönsäurenitril (nach B.A. Arbuzov⁽¹⁰⁶⁾)

Darstellung des Katalysators:

15 g Raney-Legierung werden 30 min in einer Lösung von 19,5 g NaOH in 75 ml Wasser auf 75°C erhitzt. Dann wäscht man 30 min mit der gleichen Natronlauge bei 75°C und läßt langsam abkühlen, anschließend wäscht man mehrmals mit destilliertem Wasser und bewahrt den Katalysator unter Äthanol auf.

Hydrierung:

Die Hydrierung wird in einer Hydrierapparatur bei 0,1 atm Überdruck in einer auf 75°C thermostatisierten Schüttelente durchgeführt. Dazu werden 13 g Raney-Nickel in 300 ml Butanol-1 suspendiert und mit 300 ml Wasserstoff vorhydriert. Dann gibt man 20 g Adipinsäuredinitril (0,2 Mol) hinzu und hydriert

weiter. Theoretisch sollen 9,13 l Wasserstoff aufgenommen werden. Aber erst nach einer Aufnahme von 13,2 l H₂ kann gaschromatographisch kein Dinitril mehr nachgewiesen werden.

Aufarbeitung:

Das Butanol wird am Rotationsverdampfer bei 50-60°C und 20 Torr abgezogen. Dann wird über eine 30 cm Vigreuxkolonne destilliert. Das ϵ -Aminocapronitril geht bei 120-121°C und 16 Torr über. Ausbeute: 6,00 g (0,059 Mol) ϵ -Aminocapronitril; etwa 30 % d.Th. bezogen auf das Dinitril.

Prüfung auf Einheitlichkeit

Gaschromatographisch wurde nachgewiesen, daß die dargestellte Verbindung frei von Verunreinigungen ist.

Identifizierung: Infrarotspektroskopische Daten

3200-3380 cm ⁻¹	N-H Valenzschw.	2860-2940 cm ⁻¹	C-H Valenzschw.
2250 cm ⁻¹	C $\equiv$ N	1600 cm ⁻¹	N-H Deformschw.
		1430-1470 cm ⁻¹	C-H "

Synthese von ϵ -(N-2,4-Dinitrophenyl)-aminocapronsäurenitril nach M.J. Hunter und M.L. Ludwig⁽²⁾.

2 g NaHCO₃ werden in einer Lösung von 3 ml ϵ -Aminocapronitril in Äthanol suspendiert. Dann tropft man 6 g Dinitrofluorbenzol, gelöst in 50 ml Äthanol hinzu. Zur Aufarbeitung gibt man 200 ml Wasser hinzu und saugt das ausgeschiedene Produkt über eine Fritte ab. Dieses wird in 630 ml Aceton gelöst und filtriert. Zum Umkristallisieren gibt man 370 ml H₂O hinzu und läßt bei 0°C auskristallisieren. Es fallen 4,5 g Kristallsatz an. Dieses wird ein zweites Mal aus 250 ml Aceton und 253 ml H₂O umkristallisiert. Ausbeute: 2,63 g, das sind 32 % der Theorie. Dünnschichtchromatographie: Auf Kieselgelfertigplatten mit Fluoreszenzindikator; Laufmittel: Essigester bzw. Methylenchlorid. Die isolierte Verbindung ist frei von Verunreinigungen.

Identifizierung: Infrarotspektroskopische Daten (KBr-Preßling)

3340 cm^{-1}	N-H Valenzschw.	3120 cm^{-1}	Ar-H Valenzschw.
2860-2940 cm^{-1}	C-H "	2260 cm^{-1}	C $\equiv$ N "
1800-2000 cm^{-1}	Ar-H Kombschw.	1590-1630 cm^{-1}	NO ₂ "
1050-1200 cm^{-1}	Ar-H Defschw.	1350 cm^{-1}	NO ₂ "
800- 950 cm^{-1}	Ar-H "		

Synthese von Methyl- ϵ -(N-2,4-Dinitrophenyl)aminocaproimidat·HCl

Die Vorschrift von M.J. Hunter⁽²⁾ mußte weitgehend abgeändert werden, um unter Wasserausschluß zu arbeiten. Denn das Imidat wird im Säuren zum Ester hydrolysiert.

Apperatur: Es wurde ein Zweihalskolben benutzt, an dem über einen 27 mm Schliff eine Fritte inwendig eingebaut ist. Alle Operationen werden unter trockenem Stickstoff ausgeführt. 3,6 g gut getrocknetes ϵ -(N-2,4-Dinitrophenyl)-aminocapron-säurenitril wird im Reaktionsgefäß vorgelegt. In 135 ml trockenes Methanol und 145 ml trockenen Essigester leitet man 53,6 g HCl ein. Diese HCl-Lösung wird unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit mit trockenem Stickstoff in das Reaktionsgefäß gedrückt. Man läßt 25 Stunden bei 4°C reagieren.

Zur Kristallisation saugt man in die leicht evakuierte Apperatur 1,4 l gut getrockneten Äther und läßt bei -20°C auskristallisieren. Dann drückt man die Reaktionsmischung über die Fritte hinaus und wäscht das Kristallisat dreimal mit trockenem Äther.

Ausbeute: 3,35 g = 75 % der Theorie.

Dünnschichtchromatographie: Auf Kieselgelfertigplatten mit Fluoreszenzindikator, die in einem Exsikkator über CaCl₂ in einer verdünnten HCl-Atmosphäre gelagert werden, bis der Fluoreszenzindikator nur noch schwach sichtbar ist. Auf diesen Platten findet man, daß die gesuchte Verbindung völlig sauber ist; Laufmittel; MeOH/Äther 1: 10 und MeOH/Essigester 1:1. Auf nicht mit HCl vorbehandelten Platten schmiert das Imidat sehr stark.

Schmelzpunkt: 102-3°C

Infrarotspektroskopische Daten: (KBr-Preßling)

3300-3400 cm^{-1}	N-H Valenzschw.	2940 cm^{-1}	C-H Valenzschw.
1590-1630 cm^{-1}	N-O "	1300-1350 cm^{-1}	NO_2 "
1100-1200 cm^{-1}	Ar-H Def.schw.	1090 cm^{-1}	C-O Schw.
800- 950 cm^{-1}	Ar-H "		

NMR-Spektrum: (in D_6 -DMSO)

1,5-2 ppm (δ)	6 Hs	CH_2	2,2-2,8 ppm	2 Hs	CH_2
3,3 ppm	3 Hs	OCH_3	3,3-3,7 ppm	2 Hs	CH_2
2,0 ppm	Verunrng.Essigsre.		2,4 ppm	Lsm. DMSO	
7-7,2 ppm	8,1-8,3 ppm	und 8,8-8,9 ppm		3 Hs	ArH

Analyse: $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot \text{HCl}$	C	H	N	Cl
berechnet	45,03	5,52	16,16	10,22
gefunden	45,19	5,62	15,91	10,06

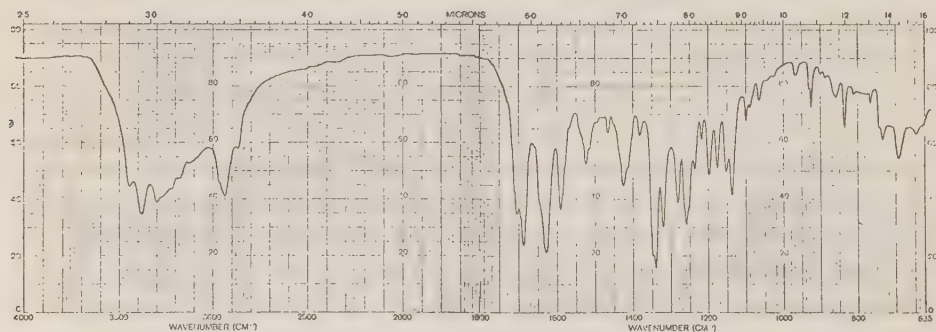


Abb. 64: IR-Spektrum des Imidoesters (NPCl)

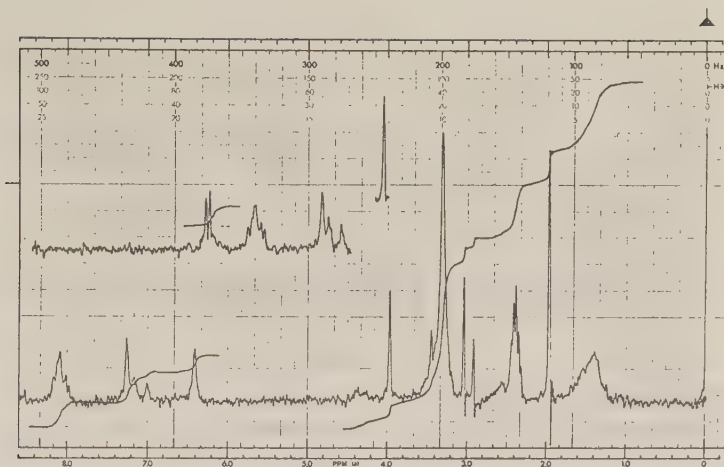


Abb. 65: NMR-Spektrum des Imidoesters (NPCI)

Eigenschaften des NPCI

Während das Hydrochlorid des NPCI in wäßriger Lösung nicht sehr stabil ist, hat der Imidoester im alkalischen Milieu eine Halbwertszeit von mehreren Std. und kann gut zur Modifizierung eingesetzt werden. Der NPCI ist in Wasser nicht löslich.

Synthese von NPCA- ϵ -Aminocapronsäure

Vorschrift:

540 mg Imidat in 4,5 ml Methanol gibt man zu 360 mg ϵ -Aminocapronsäure in 1,5 ml H₂O und stellt mit 1 N NaOH auf pH 9,5 ein. Man läßt eine Stunde bei Zimmertemperatur reagieren und zieht das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer ab. Dann gibt man 30 ml Wasser hinzu und äthert dreimal aus. Die wäßrige Phase wird eingeeengt und mit Essigsäure auf pH 5 eingestellt.

Die weitere Reinigung wird auf einer Kationenaustauschersäule Bio-Rex 70 (1 cm x 30 cm) durchgeführt. Zunächst eluiert man verschiedene Verunreinigungen mit Wasser, dann legt man einen linearen Gradienten aus je 0,3 l H₂O und 0,1 M Ammoniak an und kann so eine vollständige Reinigung der synthetisierten Verbindung erzielen.

Ausbeute: 317,5 mg = 28 % der Theorie bezogen auf die eingesetzte ϵ -Aminocaproonsäure.

Infrarotspektroskopische Daten: (KBr-Preßling)

Zu den Banden des NPCA- ϵ -aminocaproimidats kommt hinzu:
1680-1700 cm⁻¹ Carbonylschw.

Analyse: C ₁₈ H ₂₇ N ₅ O ₆	C	H	N
ber.	51,15	6,65	17,1
gef.	51,47	6,65	17,32

ϵ -NPCA-aminocaproonsäure·HCl

Synthesevorschrift:

200 mg NPCA- ϵ -aminocaproonsäure werden in 5 ml Tetrahydrofuran suspendiert und durch Zugabe von 2,5 ml 6 N HCl gelöst. Man läßt bei 4°C auskristallisieren, es bilden sich gelbe Kristallnadeln. Diese werden auf einer Fritte abgesaugt und mit wenig THF/H₂O 1:2 gewaschen.

Ausbeute: 152 mg = 70 % der Theorie.

Analyse: C ₁₈ H ₂₇ N ₅ O ₆ x HCl	C	H	N	Cl
ber.	48,49	6,33	15,71	7,95
gef.	48,57	6,46	15,73	7,99

Infrarotspektroskopische Daten: (KBr-Preßling)

3380 cm ⁻¹	N-H Valenzschw.	2940 cm ⁻¹	C-H Valenzschw.
1685 cm ⁻¹	C=O	1590-1630 cm ⁻¹	N=O, NO ₂
1320 u. 1340 cm ⁻¹	NO ₂	1135-1150 cm ⁻¹	ArH Def.schw.
		925 u. 835 cm ⁻¹	" "

UV-Spektrum:

Maxima: 262 nm und 366 nm

Minimum: 302 nm

Schulter: 406 nm

Molarer Extinktionskoeffizient bei 366 nm:

in 2%iger wäßriger Ameisensäure $\epsilon_{366} = 1,60 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

in 0,1 M Glycinpuffer pH 8 $\epsilon_{366} = 1,54 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Synthese von ϵ -NPCA- α -Carbobenzoxyl-Lysin

Vorschrift:

170 mg (0,49 mMol) NPCI·HCl werden in 3 ml Methanol gelöst und mit 1,5 ml N-Äthylmorpholin auf pH 9 eingestellt. Dazu gibt man 112 mg (0,4 mMol) α -N-Carbobenzoxyl-Lysin. Man läßt 4 1/2 Stunden bei 37°C reagieren und zieht dann im Hochvakuum das Lösungsmittel ab. Zur Prüfung auf Vollständigkeit der Umsetzung wurde eine Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel durchgeführt. (Laufmittel II). Abb.: 66)

Ergebnis: Der Imidoester hat sich vollständig umgesetzt, das liegt an der guten Löslichkeit des NPCI in 55%iger Methanol-H₂O Mischung. R_F-Werte im Laufmittel II: NPCI = 0,75; ϵ -NPCA- α -Carbobenzoxyl-Lysin = 0,64

Abspaltung der Cbo-Gruppe

Vorschrift:

Das rohe ϵ -NPCA- α -Cbo-Lysin wird in 1 ml konz. HCOOH gelöst und mit 5 ml 6 N HCl versetzt. Im Einschlußrohr erhitzt man 3 Stunden lang auf 108°C und zieht dann das Lösungsmittel ab. Die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel zeigt, daß die Abspaltung der Carbobenzoxygruppe nahezu vollständig ist (siehe vorige Seite, Abb. 66). R_F -Werte für das Laufmittel II: ϵ -NPCA- α -Cbo-Lysin $R_F = 0,64$ ϵ -NPCA-Lysin $R_F = 0,49$

Reinigung des ϵ -NPCA-Lysins

Das Rohprodukt wurde durch eine präparative Dünnschichtchromatographie aufgetrennt, die Hauptbande ausgekratzt und mit Methanol-20%iger wäßriger Essigsäure (5:1) vom Kieselgel gelöst. Die so erhältliche Acetatform des ϵ -NPCA-Lysins wurde lyophilisiert, dann in 1 ml MeOH/H₂O (10:1) gelöst und der Niederschlag aus Kieselgel abzentrifugiert. Nach tropfenweiser Zugabe von Isopropanol wurde zunächst noch gelöstes Kieselgel gefällt. Nach Zugabe von insgesamt 50 ml Isopropanol fiel die Hauptmenge des NPCA-Lysins aus. Das gefällte NPCA-Lysin wurde in 2 ml 6 N HCl gelöst und in das Hydrochlorid überführt. Nach Lyophilisieren erhielt man das NPCA-Lysin·HCl; dieses löst sich im Gegensatz zur Acetatform sehr gut schon in geringen Mengen von Methanol.

Im NPCA-Lysin·HCl lassen sich dünnsschichtchromatographisch keine Verunreinigungen nachweisen.

Ausbeute: 45 mg ϵ -NPCA-Lysin, das sind 23 % der Theorie, bezogen auf α -N-Cbo-Lysin.

Identifizierung des ϵ -NPCA-Lysins

Infrarotspektroskopische Daten (KBr-Preßling)

3370 cm ⁻¹	N-H Valenzschw.	3100 cm ⁻¹	NH ₃ ⁺ Valenzschw.
1680 cm ⁻¹	C=O "	1595 u. 1630 cm ⁻¹	N=O, NO ₂ "
1320 u. 1340 cm ⁻¹	NO ₂ " sy.	1135-1150 cm ⁻¹	ArH Def.schw.
		835 u. 925 cm ⁻¹	" "

NMR-Spektrum (in DMSO D_6)

1,4-2 ppm	12 Hs	CH_2	3-3,6 ppm	6Hs	CH_2
8-8,8 ppm	3 Hs	ArH			
2,5 ppm	Lösungsm. DMSO		4 ppm	Acide Hs und H_2O	

In allen charakteristischen Banden des IR-Spektrums, besonders im Fingerprintgebiet, ist eine Übereinstimmung mit dem Spektrum der NPCA-Aminocapronsäure zu beobachten. Zusätzlich zeigt das Spektrum des NPCA-Lysins eine NH_3^+ -Streckschwingung bei 3100 cm^{-1} , die charakteristisch für α -Aminocarbonsäuren ist.

UV-Spektrum (in wäßriger, 2%iger HCOOH)

Maxima: 260 nm und 366 nm

Minimum: 303 nm

Schulter: 408 nm

Das UV-Spektrum des NPCA-Lysins ist identisch mit dem der NPCA-Aminocapronsäure.

Spektroskopische Messungen

IR-Spektren

Zur Aufnahme der IR-Spektren diente ein Perkin-Elmer 157 Gitterspektrometer. Die Spektren wurden in einem Bereich von 625 bis 4000 cm^{-1} aufgenommen. Es ist jeweils die Lage der intensivsten Banden in cm^{-1} angegeben und zugeordnet.

UV-Spektren

Die UV-Spektren wurden mit einem Beckmann DB-Gitterspektrometer (Wellenbereich 200 bis 800 nm) aufgenommen. Zur Messung von Einzelextinktionen diente ein Eppendorf Photometer mit thermostatisierten Küvetten. Filter: 366 nm, 405 nm, 436 nm, 546 nm, 578 nm.

¹H-Kernresonanzspektren

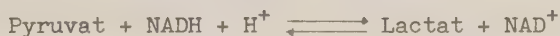
Die ¹H-NMR-Spektren wurden an einem Varian A-60 Gerät aufgenommen. Als innerer Standard diente Tetramethylsilan.

Gaschromatographie

Es wurde ein Perkin Elmer Fraktometer F 20 H mit WLD benutzt. Angeschlossen war ein Kompensationsschreiber RE 511. Säulen waren: 2 m Stahlsäule mit Carbowax 20 M auf Chromosorb C und 1 m Stahlsäule mit Silikongummi SE 30 auf Kieselgel. Arbeitsbedingungen waren: 160°C Säulentemperatur und 0,8 atm Heliumdruck.

Aktivitätsmessung

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte im Eppendorf Photometer bei 366 nm in einer thermostatisierten Küvette bei 25°C. Gemessen wurde die mit Abnahme der 366 nm Extinktion angezeigte Abnahme der NADH-Konzentration während der Umsetzung:



Diese Umsetzung wird durch die Lactatdehydrogenase katalysiert und erlaubt somit eine Messung der Enzymaktivität.

Testansatz:

Die Testlösung; Gesamtvolumen 2 ml; ist 67 mM an Phosphatpuffer pH 7,2; 0,4 mM an NADH und 0,5 mM an Pyruvat.

Für die modifizierte LDH mit 8 und mehr Amidinogruppen pro UE Enzym wurde der Aktivitätstest auch variiert:

Testlösung für hochmodifizierte LDH:

Gesamtvolumen 2 ml, 0,1 M an Glycinpuffer pH 7,5; 0,4 mM an NADH und 0,5 mM an Pyruvat.

Eine Erhöhung der NADH- oder der Pyruvatkonzentration brachte keine Zunahme der Umsetzungsgeschwindigkeit.

Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach der Biuretmethode⁽⁸⁸⁾ bestimmt. DMSO und Natriumsulfit mußten vor der Messung entfernt werden. Das geschah entweder durch Dialyse oder durch TCA-Fällung des Proteins.

Mikrobiuretansatz ohne Fällung:

Zu 0,25 ml Biuretlösung gibt man 0,01 bis 0,05 ml Proteinlösung. Nach 45 min füllt man mit Wasser auf 0,5 ml auf und mißt in einer 0,2 x 2 cm Küvette bei 546 nm. $F = 0,83$.

Mikrobiuretansatz mit TCA-Fällung:

Zu 0,1 ml Proteinlösung gibt man 0,02 ml 3 M TCA in einem 0,6 x 4 cm Borosilikatglas. Nach Zentrifugation in der Tischzentrifuge wäscht man den Niederschlag mit wenig Wasser und nach erneuter Zentrifugation setzt man 0,25 ml Biuretlösung hinzu. Nach 45 min gibt man 0,25 ml H_2O hinzu und mißt wie beim obigen Ansatz.

Die Proteinbestimmung bei unmodifizierter LDH wurde auch durch Messung der Extinktion bei 280 nm durchgeführt. $A_{280}^{0,1\%} = 1,32$

Die Proteinbestimmung bei modifizierter LDH wurde durch Messung der Extinktion bei 366 nm bestimmt, wenn die Zahl der Amidinogruppen pro UE feststand.

Elektrophorese auf Celluloseacetat-Folien

Die Elektrophoresen wurden auf 25,5 x 145 mm großen Celluloseacetat-Folien (Fa. Macherey, Nagel & Co.) in der Boskamp-Mikrophor-Apparatur bei einer Spannung von 300 Volt durchgeführt. Der Elektrodenpuffer war 0,05 M Glycin/NaOH pH 8,7, die Elektrophoresedauer betrug 80 Minuten.

Unbedingt notwendig ist vor dem Lauf die Benetzung der Folien in 0,05 M Glycinpuffer pH 8,7, 10^{-3} M NAD^+ , 2×10^{-4} M Na_2SO_3 mit einem Zusatz von 40 % Dimethylsulfoxid. Ohne den Zusatz von DMSO ist die Adsorption der modifizierten LDH an das Celluloseacetat so groß, daß das Protein bis zum Auftragspunkt schmiert. Abb. 67)

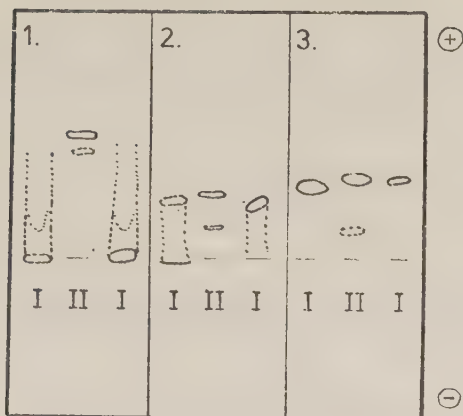


Abbildung 67: Elektrophoresen nach Behandlung der Folien mit verschiedenen Konzentrationen von DMSO im Puffer:

1): ohne DMSO 2): mit 30 % DMSO

3): mit 50 % DMSO

I: modifizierte LDH mit 9 Amidinogruppen pro UE
Enzym

II: nicht modifizierte LDH

Anfärbung mit 0,02%iger Nigrosinlösung in 2%iger Essigsäure.

Enzymspezifische Tetrazoliumsalz-Anfärbung der LDH⁽⁸⁹⁾.

In 10 ml verflüssigter Agarose (0,4 % in 0,1 M Glycinpuffer pH 7) wurden 200 mg Natriumlactat, 5 mg NAD⁺, 10 mg 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2-)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) und einige Körnchen Phenazinummethosulfat (PMS) gelöst. Celluloseacetatfolien wurden mit Auftragseite auf die auf Objektträgern ausgegossene und erstarrte Mischung gelegt. Nach 10 bis 20 min bei 37°C waren die Enzymbanden gut angefärbt.

Proteinspezifische Anfärbung der LDH

Die Acetatfolien wurden bis zu 14 h in eine 0,02 %ige wäßrige Nigrosinlösung gelegt, die außerdem 5 % Trichloressigsäure oder 2 % Essigsäure enthielt.

Transparenz und Fixierung der Folien

Die Folien wurden feucht auf einen Objektträger aufgebracht und mit einer Walze angedrückt. Dann wurden sie in einem Transparenzbad (Butanol-2/Eisessig 1:9) durchsichtig gemacht. Besonders die LDH-spezifische Anfärbung ist so bedeutend besser sichtbar.

Bestimmung der Zahl der SH-Gruppen

Die Zahl der SH-Gruppen pro Untereinheit der LDH wurde nach Ellman⁽⁸⁵⁾ bestimmt. 5,5'-Dithiobis-2,2'-nitrobenzoesäure (DTNB) reagiert mit SH-Gruppen zu einem gemischten Disulfid, die Extinktion wird photometrisch bei 405 nm bestimmt.
($\epsilon = 1,35 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Durchführung der Messung

1,0 ml 10 M Harnstofflösung in 67 mM Phosphatpuffer pH 7,2 + 0,1 % EDTA, X ml Proteinlösung (etwa 0,5 mg Protein) bzw. H₂O im Blindwert.

Messung der Proben gegen Luft: E_1

0,05 ml DTNB-Lösung (4 mg/ml in Phosphatpuffer pH 7,2) nach 20 min Messung der Extinktion gegen Luft: E_2

Berechnung der Zahl der freien SH-Gruppen:

$$n = \frac{(E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Blindwert}} \cdot \text{Küvettenvolumen} \cdot \text{Molgew}}{\epsilon \cdot \text{Proteinmenge im Test}}$$

$$n = \frac{\Delta E \cdot (1,05 + X) \cdot 2,63}{X(\text{ml}) \cdot c \text{ (mg/ml)}}$$

Optische Rotationsdispersion (ORD)

Die ORD-Spektren wurden in dem registrierenden Spektralarimometer "Cary 60" der Applied Physics Corporation Monrovia, Californien aufgenommen. Die Schichtlänge der Küvette betrug bei allen Messungen 0,5 cm. Die Lösungen wurden durch Zentrifugation bei 20.000 U/min von Schwebstoffen befreit. Die modifizierte LDH war in 0,1 M Glycin/NaOH-Puffer pH 8 gelöst.

Dialyse und Konzentrierung

Die Dialyse der Enzymlösungen erfolgte in Visking-Dialysesschläuchen bei 4°C und unter Rühren auf dem Magnetrührer. Die Einengung großer Volumina von hoch modifizierter LDH erfolgte durch Fällung bei Dialyse gegen m/15 Phosphatpuffer pH 7,2 und Aufnahme des Niederschlags in 0,1 M Glycinpuffer pH 8 unter Zusatz von $5 \cdot 10^{-4}$ M NAD^+ und 10^{-4} M Natriumsulfit.

Kleine Volumina von Proteinlösungen wurden mittels Ultrafiltration eingengt. Die Ultrahülsen, UH 100 mit einer Trenngrenze von 20.000 Dalton, und die Ultrahüsenapparatur stammten von Schleicher und Schüll, Dassel.

Entsalzung von NAD^+ - Sulfit-stabilisierter amidinierter LDH

Die modifizierte LDH wird mit $5 \cdot 10^{-4}$ M NAD^+ und 10^{-4} M Sulfit in 0,1 M Glycinpuffer pH 8 stabilisiert. Für kinetische Untersuchungen ist es wichtig, dieses NAD^+ wieder vollständig zu entfernen. Das gelingt durch eine Molekularsiebchromatographie auf Sephadex G 25 sf. Für die Entsalzung von 20 μl bis 50 μl einer hoch konzentrierten stabilisierten Enzymlösung der amidinierten LDH wurde eine Molekularsiebchromatographie auf einer 1 cm x 10 cm Sephadex G 25 superfine Säule durchgeführt. Elutionsmittel war 0,2 M Glycinp. Die Fraktionen wurden direkt in einem LKB-Fraktionssammler aufgefangen (ohne Durchflußküvette, weil die Volumina zu klein sind). Von den aufgefangenen Fraktionen wurden dann von aliquoten Anteilen Verdünnungen durchgeführt und die Extinktion für 366 nm und 260 nm bestimmt, (Abb. 68)

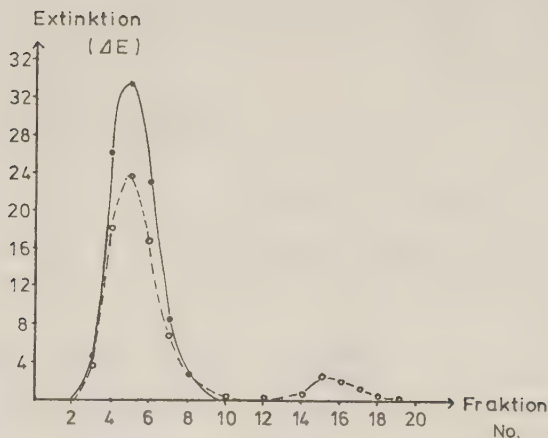


Abb. 68: Elutionsdiagramm: zur Entsalzung kleiner Mengen von LDH

— : Extinktion bei 366 nm

- - - : Extinktion bei 260 nm

Die Extinktion für die Fraktionen wurde am Beckmann-spektrophotometer gemessen

NAD^+ -Gehalt von molekularsiebchromatographierter amidinierten LDH

Für eine amidinierte LDH mit 6 Amidinogruppen pro UE Enzym wurde nach der Entsalzung auf Sephadex G 25 sf der noch gebundene Anteil von NAD^+ bestimmt.

Hierzu wurden 0,1 ml der NPCA-LDH-Lösung mit 3,45 mg/ml Protein über die 1 cm x 10 cm Säule entsalzen und nach Fällung des Proteins mit 10%iger Perchlorsäure die Menge an NAD^+ im Überstand bestimmt. Die von der Säule eluierte amidinierte LDH, 0,4 ml wurde mit 0,034 ml 70%iger Perchlorsäure gefällt

das entspricht einer Perchlorsäurekonzentration von 10 % bzw. 1 M. Nach Zentrifugation und Verdünnung auf 1 ml wurde gegen eine entsprechend verdünnte Perchlorsäurelösung die Extinktion bei 260 nm gemessen. Ergebnis: Es wurde $E_{260} = 0,01$ und ein Einbau von 0,09 Mol NAD^+ pro UE Enzym gefunden.

Peptidbestimmung nach Moore und Stein⁽⁹⁰⁾

Aus jeder Probe wird ein aliquoter Anteil, der etwa 0,1 μMol Peptid enthält, entnommen und mit 0,25 ml 4 M NaOH eine Stunde im siedenden Wasserbad in Polypropylenröhrchen erhitzt. Dazu gibt man 1 ml Puffer pH 5,51 (180 g $\text{NaOAc} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 33,5 ml HOAc und 5,4 g konz. HCOOH auf 1 l H_2O) außerdem gibt man 1 ml 1 M HCl und 1 ml 3%ige Ninhydrinlösung in Methylcellosolve hinzu. Dieses Gemisch wird 15 min in siedendem Wasserbad erhitzt. Nach 30 minütigem Abkühlen wird die Extinktion bei 578 nm im Eppendorf Photometer in 1 cm Küvetten gemessen.

Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wird auf DC-Fertigplatten der Firma Merck 20 x 20 cm durchgeführt. Die Beschichtung besteht aus 0,25 mm Kieselgel 50 ohne Fluoreszenzindikator. Aufgetragen wurden etwa 20 nMol Peptidmischung.

Fließmittel:	I Butonal-2	70
	Ameisensäure	9
	Wasser	21
	II Butanol-1	68
	Pyridin	40
	Eisessig	14
	Wasser	25

Elektrophorese⁽⁹⁹⁾

Die Elektrophorese wurde auf DC-Fertigplatten der Firma Merck 20 x 20 cm durchgeführt. Die Beschichtung besteht aus 0,25 mm Kieselgel 60 ohne Fluoreszenzindikator. Die Apperatur war der

Pherograph Original-Frankfurt, Modell 64 (von L. Hormuth, Inh. W.E. Vetter) Spannung: 1000 V, Stromstärke: 35 mA, Laufzeit: 1,5 h.

Elektrophoresepuffer I	pH 6,4:	Pyridin	200
		Essigsäure	8
		Wasser	1800
Elektrophoresepuffer II	pH 3,2:	Pyridin	10
		Essigsäure	90
		Wasser	900

Farbentwickler zur Anfärbung von Peptiden auf Kieselgelplatten.
Ninhydrinreagens⁽⁹¹⁾

Die Lösung besteht aus:

- 1 g Ninhydrin
- 60 ml Methanol
- 350 ml Butanol-1
- 30 ml 2 M Essigsäure

Die getrocknete Dünnschichtplatte wird mit dem Ninhydrinreagens leicht eingesprüht, so daß die Oberfläche feucht ist, dann wird sie für 15 min bei 100°C im Trockenschrank erhitzt.

Pauly's Reagenz für Histidin und Tyrosin

Eine Spatelspitze diazotierter Sulfanilsäure wird in 1 ml 10%iger Natriumcarbonatlösung gelöst und damit die Platte besprüht. Histidin wird rot und Tyrosin braun angefärbt

Aminosäureanalysen

Aminosäureanalysen wurden mit dem Aminosäureanalysator BV-200 der Firma Bio-Cal, München durchgeführt.

Vorbereitung der Probe: Etwa 10 nMol Peptid werden in einem Pyrex-Reagenzglas mit 0,3 ml 6 M HCl versetzt und unter Vakuum abgeschmolzen. Nach 20 Stunden Hydrolyse bei 108°C wird die Ampulle geöffnet, die HCl im Vakuum abgezogen, der Rückstand mit 1,2 ml 0,2 M Natriumcitratpuffer pH 2,2 aufgenommen und in den As-Analysator gegeben.

Dansylierung und Identifizierung der Dansylaminosäuren

Die Dansylierung wurde nach der Methode von K.R. Woods und K.T. Wang durchgeführt⁽⁵⁹⁾.

3 bis 4 nMol eines Peptids werden in 20 μ l 0,1 M NaHCO_3 -Lösung mit 20 μ l einer Dansylchloridlösung (1 mg/ml in Aceton) in einem 0,6 x 4 cm Pyrexglas umgesetzt. Nach 5 h bei 23°C ist die Reaktion beendet und das Lösungsmittel wird im Vakuum abgezogen.

Zur Totalhydrolyse gibt man 50 μ l 6 N HCl hinzu und schmelzt das Gläschen unter Vakuum ab. Nach 4 h bei 108°C wird die Ampulle geöffnet und die HCl im Vakuum entfernt.

Die Probe wird in Aceton-Eisessig 3:2 (in 5 μ l) gelöst und auf eine DC Fertigfolie F1700 Mikropolyamid (Schleicher & Schüll) 7,5 x 7,5 cm aufgetragen. Auf der Rückseite der Platte trägt man gegenüber der Probe die erwarteten Dansylaminosäuren zum Vergleich auf.

Chromatographie: 1. Dimension: Wasser/HCOOH 75:1

2. " : Benzol/Eisessig 9:1

Trenng. Asp, Glu:2. " : n-Heptan/n-Butanol/Eisessig 3:3:1

Kationenaustauscherchromatographie⁽¹⁰⁰⁾

Verwendet wurde der stark basische Kationenaustauscher SE-Sephadex C 25.

Vorbereitung des Austauschers: Die benötigte Menge Austauscher wird über Nacht in 2 M Pyridin-acetatpuffer pH 5,4 gequollen. Auf der Nutsche wäscht man dann noch fünfmal mit diesem Puffer. Dann wäscht man den in die Pyridinium-Form überführten Austauscher mit Wasser neutral. Schließlich wäscht man mit 0,022 M Pyridinacetatpuffer pH 2,2, der 25 % Propanol enthält.

Verwendet wurden zwei Säulen, mit den Ausmaßen 0,6 x 30 cm und 1 x 80 cm. Die Säulen waren mit einem Thermostatisierungsmantel versehen und wurden von einem Thermostaten der Firma Haake, Karlsruhe konstant auf 35°C gehalten. Nach dem Füllen der Säulen wurden diese mit 50 ml Puffer I bzw. 200 ml Puffer I bei der großen Säule äquilibriert.

Flußgeschwindigkeit: 12 ml/h bzw. 30 ml/h bei der gr. Säule.
Die Peptide wurden gelöst in Puffer I/Ameisensäure 1:1 und
auf die Säule gegeben.

1 Fraktion: 20 min = 3 ml bzw. 7,5 ml bei der gr. Säule.

Elutionspuffer:

- I 0,022 M Pyridin-formiat-acetatpuffer pH 2,3 25 % Propanol-1
1,76 ml Pyridin
33,00 ml Eisessig
30,00 ml Ameisensäure
250,00 ml Propanol-1 ad 1 l Wasser
- II 0,22 M Pyridinacetatpuffer pH 4 25 % Propanol-1
17,6 ml Pyridin
94,0 ml Eisessig
250,0 ml Propanol-1 ad 1 l Wasser
- III 1,5 M Pyridinacetatpuffer pH 5,4 25 % Propanol-1
120,0 ml Pyridin
37,5 ml Eisessig
250 ml Propanol-1 ad 1 l Wasser
- IV 6 M Pyridinacetatpuffer pH 6,5
480,0 ml Pyridin ad 1 l Wasser
mit Eisessig auf 6,5 eingestellt.

Die Säule wird zunächst mit Puffer I eluiert, 75 ml bzw. 250 ml
für die große Säule. Dann wird mit dem ersten linearen Gra-
dienten aus je 75 ml I und II eluiert. (Je 250 ml für die gr.
Säule). Dann folgt der zweite lineare Gradient mit je 75 ml
Puffer II und III (bzw. 250 ml) Der dritte lineare Gradient
besteht aus je 75 ml Puffer III und IV (bzw. 250 ml für die
gr. Säule)

Die bei 366 nm absorbierenden Fraktionen wurden mit dem UV-
Monitor CE 212 erkannt und mit einem LKB-Fraktionssammler auf-
gefangen.

Anionenaustauscherchromatographie^(101,102)

Verwendet wurde der schwach saure Anionenaustauscher DEAE-Sephadex A-25. Der Austauscher wurde in 0,5 M Ammoniumacetatlösung gequollen und mehrmals mit dieser Lösung gewaschen, bis im Überstand keine Chloridionen mehr nachzuweisen waren. Dann wurde gründlich mit Wasser gewaschen. Schließlich wurde der Austauscher mit dem Puffer I gewaschen.

Verwendet wurde eine 0,6 x 30 cm Säule, die während des Trennexperimentes auf 35°C thermostatisiert wurde. Nach dem Füllen der Säule wurde diese mit 50 ml Puffer I äquilibriert. Flußgeschwindigkeit: 12 ml/h. Die Peptide wurden gelöst in Puffer I, mit N-Äthylmorpholin auf pH 10,5 eingestellt, auf die Säule gegeben. 1 Fraktion = 20 min, das sind 3 ml.

Elutionspuffer:

I: 15 ml N-Äthylmorpholin

20 ml α -Picolin

10 ml Pyridin

300 ml Propanol-1 ad 1 l pH 9,5 (mit HOAc eingestellt)

II: wie I, aber auf pH 7,6 mit Eisessig eingestellt

III: 0,2 M Essigsäure 30 % Propanol-1

IV: 2,0 M Essigsäure 30 % Propanol-1

Nach Elution mit 75 ml Puffer I wurde mit dem ersten sigmoidalen Gradienten aus je 75 ml Puffer I und II eluiert. Dann folgte der zweite sigmoid. Gradient durch Zugabe des Puffers III in die Mischkammer und schließlich der dritte sigmoidale Gradient durch Zugabe des Puffers IV.

Die bei 366 nm absorbierenden Fraktionen wurden mit einem "Variablen Wellenlängen UV-Monitor CE 212" von Cecil Instruments erkannt und mit einem LKB-Fraktionssammler aufgefangen.

Dünnschicht-Gelchromatographie^(83,84)

Die Dünnschicht-Gelchromatographie wurde auf Glasplatten 20 x 20 cm in einer 0,8 bis 1 mm dicken Schicht Sephadex G 200 sf

durchgeführt. Als Elutionsmittel diente 1 M Glycin-NaOH Puffer pH 8. Auf der Platte wurden die verschiedenen Proben, darunter Cytochrom C und ϵ -NPCA-Aminocapronsäure als Referenzsubstanzen nebeneinander aufgetragen (jeweils 5 λ von konzentrierten Proteinlösungen, 5 mg/ml). Bei 20° Fließwinkel betrug die Laufzeit etwa 2 Stunden. Die Flecken waren für die modifizierte LDH durch die Eigenfarbe sichtbar, die native LDH wurde enzymspezifisch angefärbt.

Molekularsiebchromatographie^(97,98)

Zur molekularsiebchromatographischen Reinigung von Peptiden wurde eine 3 cm x 170 cm Säule mit Sephadex G 25 f Trennbereich 1000-5000 D benutzt. Das Elutionsmittel war 30%ige Essigsäure. Die Peptidmischung wurde gelöst in konzentrierter Ameisensäure aufgegeben.

Flußgeschwindigkeit: 70 ml/h.

1 Fraktion: 200 Tropfen = 7,4 ml

Außerdem wurde eine 3 cm x 180 cm Säule Sephadex G 50 f, Trennbereich 1500-30.000 D, benutzt. Das Elutionsmittel war ebenfalls 30%ige Essigsäure.

Flußgeschwindigkeit: 50 ml/h

1 Fraktion: 300 Tropfen = 11 ml

Die Trennung von modifizierter denaturierter und modifizierter nativer LDH.

Zur molekularsiebchromatographischen Trennung von nativem und aufgefaltetem denaturiertem Enzym wurde eine 3 x 180 cm Säule mit Sephadex G 200 f eingesetzt. Der Trennbereich liegt bei diesem Molekularsieb zwischen 5000 und 800.000 Dalton; die aufgefaltete denaturierte LDH kommt im Ausschlußvolumen, da sie einen bedeutend größeren wirksamen Molekülradius als die native globuläre Form besitzt.

Flußgeschwindigkeit: 20 ml/h, bei 17 cm Wassersäule Druck.

Elutionspuffer: 0,1 M Glycin/NaOH pH 8, $5 \cdot 10^{-4}$ M NAD^+ , 10^{-4} M Natriumsulfit, 10^{-4} M EDTA, 0,02 % Azid.

1 Fraktion: 75 Tropfen = 6,6 ml

Gegenstromverteilung

Zur Vorfraktionierung der Peptidmischung nach der Molekularsiebchromatographie wurde eine Gegenstromverteilung durchgeführt.

Es wurde eine automatische Verteilungsbatterie der Firma Labortec, Basel, benutzt. In jedem Gläschen befanden sich 25 ml Ober- und 25 ml Unterphase. Die zu trennenden Peptide wurden im Zweiphasensystem des ersten Gläschens gelöst. Die Apparatur hatte insgesamt 170 Gläschen.

Das Zweiphasensystem bestand aus Butanol-1/ H_2O /Essigsäure/Pyridin 40:40:3:3; es wurde in 5 l-Schütteltrichtern angesetzt. Die Apparatur wurde folgendermaßen eingestellt:

Transfers:	163
Schüttelbewegungen:	6
Schüttelintensität:	52
Trennzeit:	3 min

Zur Identifizierung der amidinierten Peptide wurde die Extinktion bei 366 nm im Eppendorf Photometer gemessen, + 10 % Methanol. Im Recyclingprozeß wurden weitere 176 Transfers durchgeführt. Zum Schluß wurden 200 Transfers in einen synchron laufenden LKB-Fraktionssammler durchgeführt. Um einen Gleichlauf mit dem Fraktionssammler zu erzielen, mußte man die Geräte folgendermaßen einstellen:

Schüttelbewegungen:	12	Fraktionszeit:	7,9 min
Trennzeit:	6 min	Start:	5. min Trennzeit

Die Extinktionsmessung wurde in einer 2-cm Küvette durchgeführt 10 % Methanol wurde zugegeben, damit die Trübung verschwand.

Vorversuche zur Gegenstromverteilung

Zunächst wurde nach einem Zweiphasensystem gesucht, in dem eine möglichst weitgehende Trennung der modifizierten Peptide möglich ist. Das ist im System Butanol-1/Wasser/Essigsäure/Pyridin (40:40:3:3) möglich.

Für eine grobe Bestimmung der Verteilungskoeffizienten des aufzutrennenden Proteins wurde per Hand 6 Transfers mit ca. 1 mg Protein je 0,5 ml Ober- und Unterphase durchgeführt. Von den sechs Unter- und Oberphasen wurde jeweils ein aliquoter Teil für die Proteinbestimmung entnommen. Die Proteinbestimmung wurde nach alkalischer Hydrolyse nach der Methode von Moore und Stein⁽⁹⁰⁾ mit Ninhydrin durchgeführt. Außerdem wurde jeweils die Extinktion bei 366 nm gemessen, um so den jeweiligen Gehalt an amidinierten Proteinen festzustellen. Die Ergebnisse sind im folgenden Bild gegen die Fraktionsnummer aufgetragen; Abbildung 69 und 70.

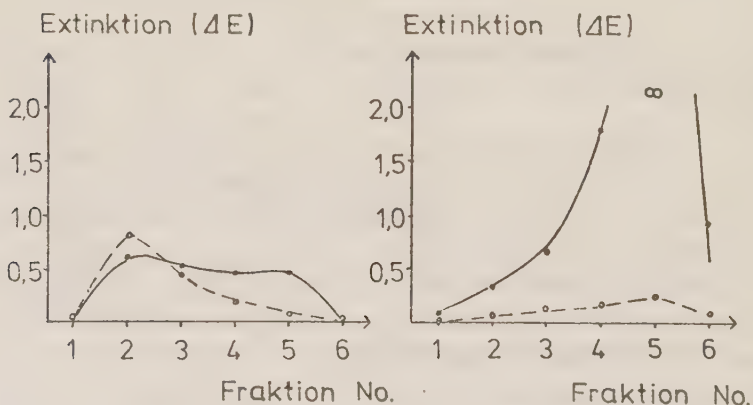


Abbildung 69: Fraktionen der Oberphase

Abbildung 70: Fraktionen der Unterphase

in beiden Abbildungen bedeutet:

---: Extinktion 366 nm

—: Ninhydrinabsorption

Die Dünnschichtchromatographie zum Gegenstromverteilungs-
vorversuch.

Von den sechs Fraktionen wurden jeweils Unter- und Oberphase
auf Kieselgelplatten chromatographiert. Laufmittel: II
Die gelb gefärbten Peptide waren von sich aus sichtbar,
angefärbt wurde mit Ninhydrin auf Aminogruppen und an-
schließend mit der Chlor-Jod-Benzidin Probe auf Peptid-
bindungen, Abb. 71).

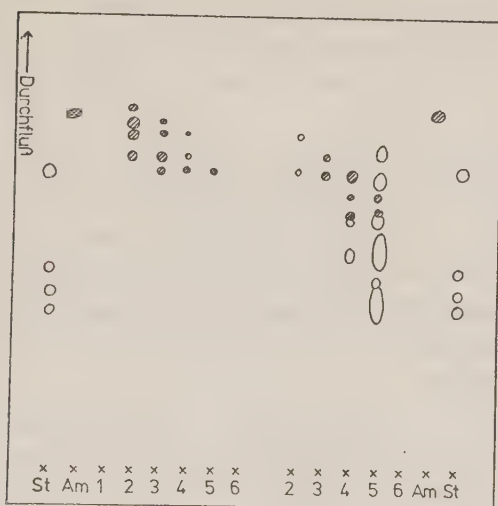


Abbildung 71: Dünnschichtchromatogramm für den Vorversuch
zur Gegenstromverteilung

St.: Aminosäurenstandard

Am: ϵ -Amidinocapron-
säure

No. 1 bis 6 sind die erhaltenen Fraktionen,
linke Seite: Oberphase, rechte Seite: Unterphase

▨: gelbe Flecken

- 1) Everse, J., Kaplan, N.O., Advances in Enzymology Vol. 37 6
- 2) Rossmann, M. et al., The Enzymes 11 A 62 (1975)
- 3) Kubowitz, F., Ott, P., Biochem. Z. 314 94 (1943)
- 4) Racker, E., J.Biol.Chem. 184 313 (1950)
- 5) Loewus, f.A. Ofner, P. Fisher, H.F. Westheimer, F.H. Vennesland, B., J.Biol.Chem. 202 699 (1953)
- 6) Pullman, M.E. San Pietro, A. Colowick, S.P., J.Biol.Chem. 206 129 (1954)
- 7) Pfleiderer, G., Jeckel, D., Biochem.Z. 329 370 (1957)
- 8) Apella, E., Markert, C.L., Biochem.Biophys.Res.Comm. 6 171 (1961)
- 9) Taylor, S.,Allison, W. Kaplan, N.O., J.Biol.Chem. 250 8740 (1975)
- 10) Mella, K., Torff, H.J., Fölsche, E., Pfleiderer, G., Z.Phys.Chem. 350 28 (1968)
- 11) Holbrook, J.J., Pfleiderer, G., Mella, K., Volz, M., Liskowak, W., Jeckel, D., Eur.J.Biochem. 1 476 (1967)
- 12) Rossmann, M.G., Adams, M.J., Buehner, M., Ford, G.C., Hackert, M.L., Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 36 179 (1971)
- 13) Adams, M.J., Buehner, M., Chandrasekhar, K. Ford. G.C. Hackert, M.L., Rossmann, M.G., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70 1968 (1973)
- 14) Rossmann, M.G. et al., J.Mol.Biol. 76 533 (1973)
- 15) Holbrook, J.J., Liljas, A., Steinde, S.J., Rossmann, M.G., The Enzymes 11 A 191 (1975)
- 16) Gold, A.H., Segal, H.L., Biochemistry 4 1506 (1965)
- 17) Fondy, T.P., Kaplan, N.O., J.Biol.Chem. 240 4219 (1965)
- 18) Holbrook, J.J., Pfleiderer, G., Biochem.Z. 342 111 (1965)
- 19) Holbrook, J.J. et al, Biochem.Z. 344 14 (1966)
- 20) Gruber, W., Warzecha, K. , Pfleiderer, G., Wieland, Th., Biochem.Z. 336 107 (1962)

- 21) Holbrook, J.J., Jeckel, D., Arch.Biochem.Biophys. 122
519 (1967)
- 22) Woenckhaus, C., Berghäuser, J., Pfleiderer, G., H.S.Z.
Physiol.Chem. 350 473 (1969)
- 23) Berghäuser, J., Falderbaum, J., Woenckhaus, C.,
H.S.Z.Physiol.Chem. 352 52 (1971)
- 24) Woenckhaus, C., Schättle, E., Reinhard, J., Berghäuser, J.,
H.S.Z.Physiol.Chem. 353 559 (1972)
- 25) Berghäuser, J., Falderbaum, I., H.S.Z.Physiol.Chem. 352
1189 (1971)
- 26) Yang, P.C., Schwert, G.W., Biochemistry 11 2218 (1972)
- 27) Jeckel, D., Anders, A., Pfleiderer, G., H.S.Z.Physiol.Chem.
352 769 (1971)
- 28) Pfleiderer, G., Jeckel, D., J.Biochem. 2 171 (1967)
- 29) Means, G.E., Feeney, R.E., Chemical Modification of
Proteins Holden-Day, Inc., California S. 89
- 30) Hunter, M.J., Ludwig, M.L., Methods Enzym. 25 S. 585
- 31) Hunter, M.L., Ludwig, M.L., J.Am.Chem.Soc. 84 3491 (1962)
- 32) Hand, E.S., Jencks, W.P., J.Am.Chem.Soc. 84 3505 (1962)
- 33) Reynolds, J.H., Biochemistry 7 3131 (1968)
- 34) Neuberger, A., Biochim.Biophys.Acta 178 306 (1969)
- 35) Plapp, B.V., J.Biol.Chem. 245 1727 (1969)
- 36) Plapp, B.V., Brooks, R.L., Shore, J.D., J.Biol.Chem. 248
3470 (1972)
- 37) Plapp, B.V., Kim, J.C., Analyt.Chem. 62 291 (1974)
- 38) Plapp, B.V., Kim, J.C., Zoltobrocki, M., Biochemistry 13
899 (1974)
- 39) Plapp, B.V., Dworschak, R., Tarr, G., Biochemistry 14 200
(1975)
- 40) Kronman, M.J., Andreotti, R.E., Robbins, F.M., Biochim.
Biophys.Acta 109 223 (1965)

- 41) Anfinsen, C.B., Sela, M., Cooke, M.P., J.Biol.Chem. 227
1825 (1962)
- 42) Nishikawa, A.H., Morita, R.Y., Becker, R.R., Biochemistry
1506 (1968)
- 43) Katchalski, E., Glazer, A.N. Bar-Eli, A., J.Biol.Chem. 23
1832 (1962)
- 44) Rossmann, M.G. et al. Nature 227 1098 (1970)
- 45) Taylor, S., Oxley, S., Allison, ., Kaplan, N.O.,
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 70 1790 (1973)
- 46) Wachsmuth, E.D., Pfleiderer, G. , Wieland, Th., Biochemis
Z. 340 70 (1964)
- 47) Butler, P.J.G., Harris, J.J., Hartley, B.S., Lebermann, R
Biochem.J. 103 78 (1967)
- 48) Dixon, H.B.F., Perham, R.N., Biochem.J. 109 312(1968)
- 49) Schallenberg, E.E., Calvin, M., J.Am.Chem.Soc. 77 2779 (1955)
- 50) Goldberger, R.F., Methods Enzym. 11 317 (1967)
- 51) Ludwig, M.L., Byrne, R., J.Am.Chem.Soc. 84 4160 (1962)
- 52) Jeckel, D., Anders, R., Pfleiderer, G., H.S.Z.Physiol.Che
354 737 (1973)
- 53) Krinsky, J., Racker, E., Biochemistry 2 512 (1962)
- 54) Platt, T., Files, J.C., J.Biol.Chem. 248 110 (1972)
- 55) Feinstein, G., Gertler, A., Euro.J.Biochem. 31 25 (1972)
- 56) Taniuchi, H., Anfinsen, Ch.B., Sodja, A., ProcNat.Acad.Sc
USA 58 1235 (1967)
- 57) Markus, G., Barnard, E.A., Castellani, B., Saunders, D.,
J.Biol.Chem. 243 4070 (1968)
- 58) Gray, W.R., Methods Enzym. 25 121 (1972)
- 59) Woods, K.R., Wang, K.T., Biochim.Biophys.Acta 133 369 (1967)
- 60) Ambler, R.P., Methods Enzym. 25 262 (1972)
- 61) Petra, P.H., Methods Enzym. 14 460 (1970)
- 62) Morihara, K., Tsuzuki, H., Biochim.Biophys.Acta 118 215
(1966)

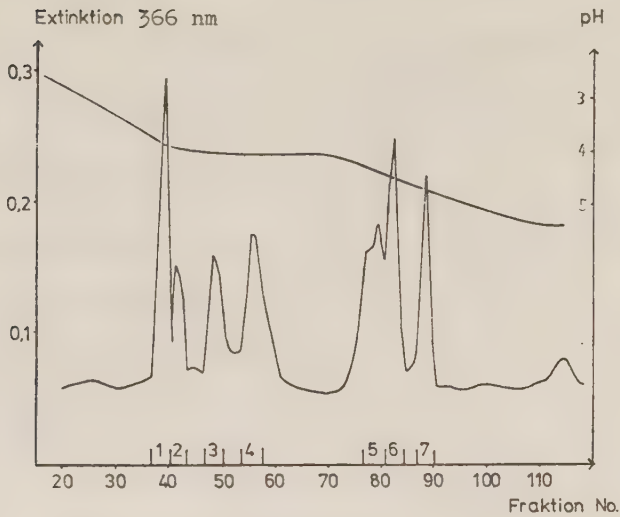
- 63) Matsubara, H., Sasaki, R., Singer, A., Jukes, T.H., Arch. Biochim.Biophys. 115 324 (1966)
- 64) Kiltz, H.H., persönliche Mitteilung
- 65) Zaki, L., Dissertation, Frankfurt (1967)
- 66) Pfleiderer, G., Holbrook, J.J., Zaki, L., Jeckel, D., F.E.B.S.L. 1 129 (1968)
- 67) Holbrook, J.J., Gutfreund, H., F.E.B.S.L. 31 157 (1973)
- 68) Schwert, G.W., Pyridine-Nucleotide-Dependant Dehydrogenases (H. Sund ed.) S. 135 Springer Verlag Berlin/New York (1970)
- 69) Tsai, C.S. et al., Biochemistry 13 440 (1974)
- 70) Fasold, H., Turba, F., Wirsching, W., Biochem.Z. 335 86 (1961 (1961))
- 71) Tuengler, P., Diplomarbeit, Bochum 1975
- 72) Foucault, G., Traore, F., Levilliers, J., Pudles, J., Eur.J.Biochem. 46 43 (1974)
- 73) Uyeda, K., Biochemistry, 8 2366 (1969)
- 74) Krönke, Staatsarbeit, Bochum 1976
- 75) Traut, R.R. et al., Biochemistry 12 3266 (1973)
- 76) Hucho, F., Janda, M., Biochem.Biophys.Res.Com. 57 1080 (1974)
- 77) Benisek, W.F., Richards, F.M., J.Biol.Chem. 243 4267 (1968)
- 78) Jaenicke, R., Eur.J.Biochem. 23 150 (1971)
- 79) Simmons, N.S., Cohen, C., Scent-Györgyi, Wetlaufer, D.B., Blout, E.R., J.Am.Chem.Soc. 83 4766 (1961)
- 80) Jeckel, D., Pfleiderer, G., H.S.Z.Physio.Chem. 350 903 (1969)
- 81) Schoellmann, G., Shaw, E., Biochemistry 2 252 (1963)
- 82) Trommer, W., persönliche Mitteilung
- 83) Jaworek, D., Chromatographia 2 289 (1969)
- 84) Jaworek, D., Chromatographia 3 414 (1970)
- 85) Ellman, G.L., Arch.Biochem.Biophys. 82 70 (1959)
- 86) Ramler, D.H., Ann. N.Y.Acad.Sci. 141 291 (1966)

- 87) Engel, P.C., Chen, S.S., Biochem.J. 149 107 (1975)
- 88) Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, T., Czok, R., Garbade K.H., Meyer-Arendt, E., Pfeleiderer, G., Z.Naturforsch. 8b 555 (1953)
- 89) Broun, G., Avrameas, S., Nature (London) 197 1208 (1963)
- 90) Moore, S., Stein, W., J.Biol.Chem. 211 907 (1954)
- 91) Clotten, R. u. A., Hochspannungselektrophorese s. 137
C. Thieme Verlag (1962)
- 92) Handbook of Biochemistry 2nd Edition S. B-93
- 93) McCoubrey, A. Smith, M.H., Biochem.Pharmacol. 15 1623 (1966)
- 94) Lineweaver, H., Burk, D., J.Amer.Chem.Soc. 56 658 (1934)
- 95) Jeckel, D., Dissertation, Univ. Frankfurt a.M. 1969
- 96) Rossmann, M.G., persönliche Mitteilung an H.H. Kiltz
- 97) Squire, P.G., Arch.Biochem.Biophys. 107 471 (1964)
- 98) Sephadex-Gelfiltration, Pharmacia GmbH, Frankfurt. Ed. 1967
- 99) Wieland, Th., BiochemZ. 340 476 (1964)
- 100) Schroeder, W.A., Methods Enzymol. 25 203 (1972)
- 101) Schroeder, W.A., Methods Enzymol. 25 214 (1972)
- 102) Hilschmann, N., Craig, L.C., ProcNat.Acad.Sci.USA 53 1403 (1965)
- 103) Weber, K., Osborn, M., J.Biol.Chem. 244 4406 (1969)
- 104) Bernfeld, P., Berkeley, B.J., Bieber, R.E., Arch.Biochem. Biophys. 111 (1965) 31
- 105) Dissertation H. Kapmeyer, Bochum Mai 1976
- 106) Arbuzov, B.A., Pozhil'tsova, E.A., Bull.acad.sci.U.R.S.S. (1946) 65 ref. CA Vol 42 5848 h
- 107) Bergmeyer, H.U. (1962) Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim

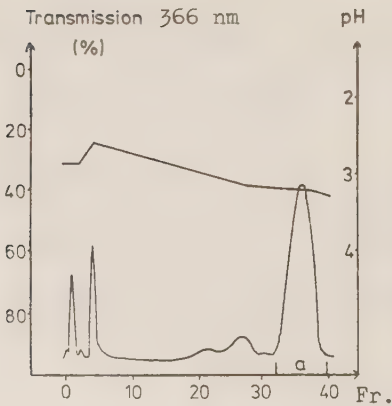
Verwendete Abkürzungen:

DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-Dithiobis-2,2'-nitrobenzoesäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
LDH H_4	Lactatdehydrogenase aus Herzmuskel
LDH M_4	Lactatdehydrogenase aus Skelettmuskel
K_m	Michaeliskonstante
MTT	3-(4,5-Dimethyl-thiazolyl-2-)2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NAD^+ , NADH	oxydiertes bzw. reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NPCA	ϵ -(N-2,4-Dinitrophenyl)aminocaproamidinat
$NPCA_{9,4}$ -LDH	ϵ -(N-2,4-dinitrophenyl)aminocaproamidinierte Lactatdehydrogenase mit durchschnittlich 9,4 eingebauten Resten pro Untereinheit.
NPCI	Methyl-[ϵ -(N-2,4-dinitrophenyl)aminocaproimidoester]·Hydrochlorid
PMS	Phenanzinmethosulfat
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UE	Untereinheit des Enzyms
V_{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit

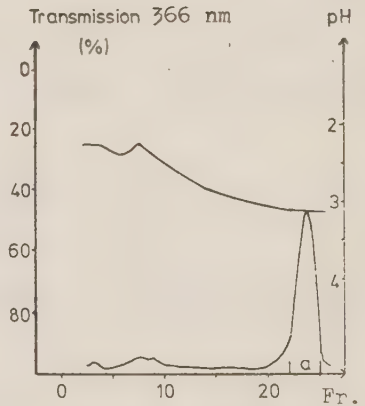
Anhang: Elutionsdiagramme zur Kationenaustauscherchromatographie der isolierten Peptide



Peptidfraktion: U-4

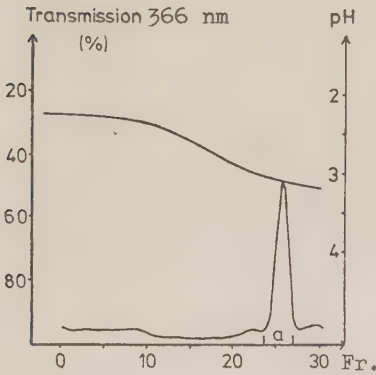


Peptidfr.: O-7-3

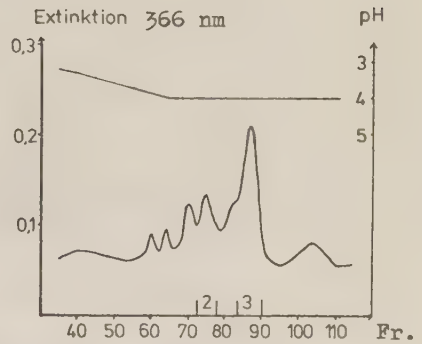


Peptidfr.: O-14-1

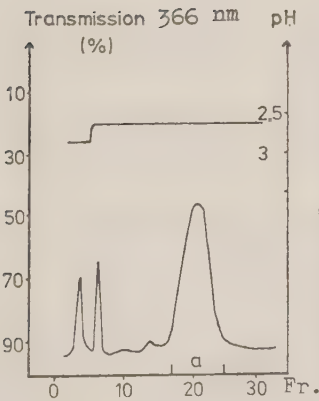
Elutionsdiagramme zur Kationenaustauscherchr. der Peptide



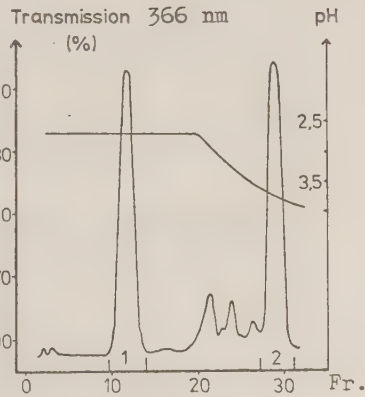
Peptidfr.: 0-14-3



Peptidfr.: 0-12'

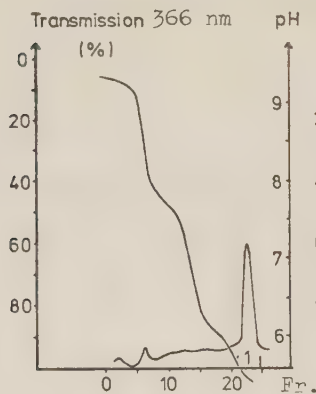


Peptidfr.: 0-4-3

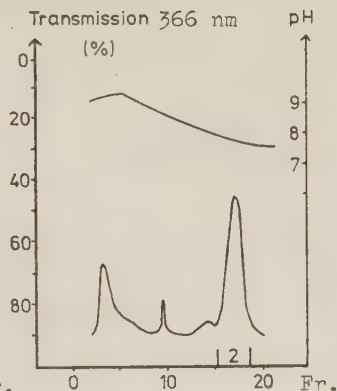


Peptidfr.: 0-4-5

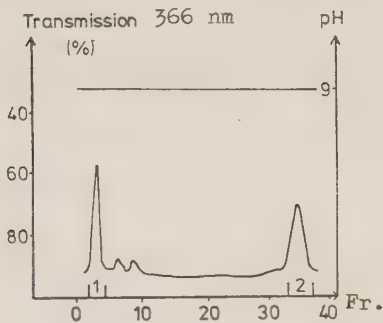
Elutionsdiagramme zur Anionenaustauscherchromatographie
der isolierten Peptide



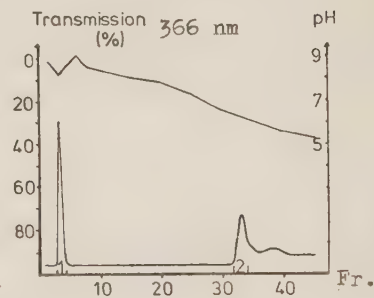
Peptidfr.: U-4-2



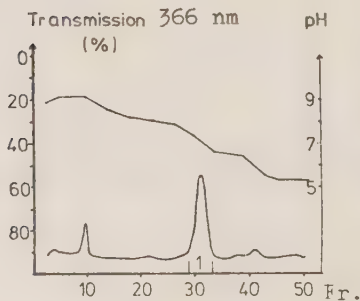
Peptidfr.: U-4-6



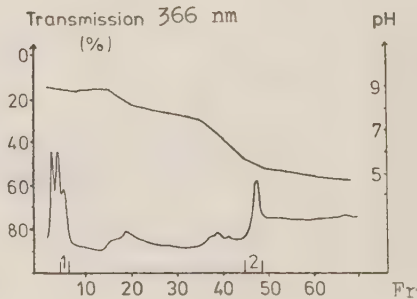
Peptidfr.: O-12-3



Peptidfr.: U-4-4



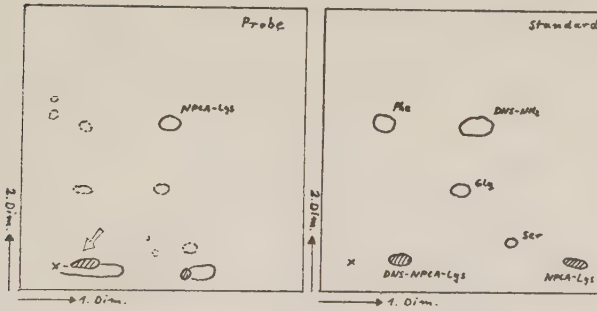
Peptidfr.: U-4-1



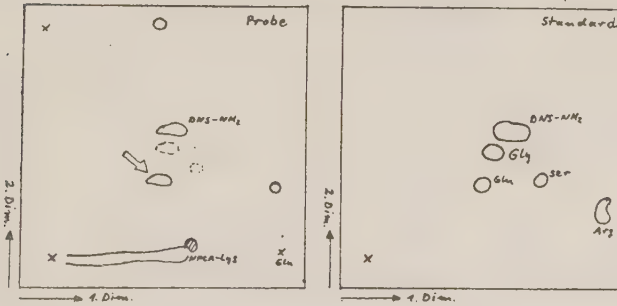
Peptidfr.: M-2-4-2-2

Anhang:

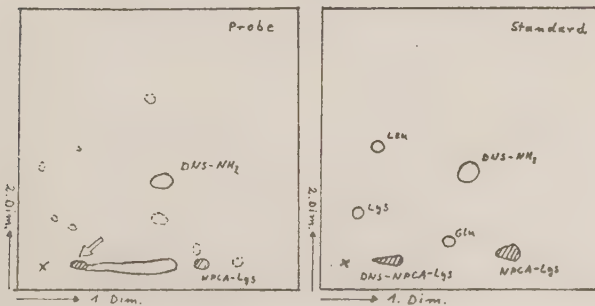
Fingerprints zur aminoterminalen Endgruppenbestimmung an den isolierten Peptiden.



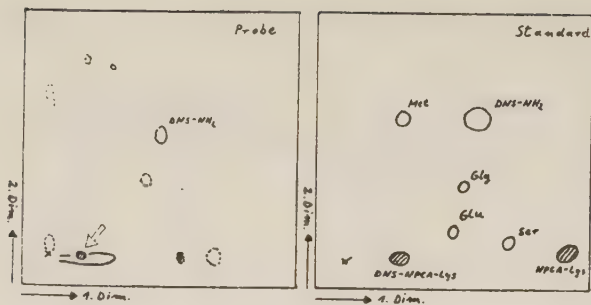
Peptid:
0-7-3-a



Peptid:
0-4-3-a

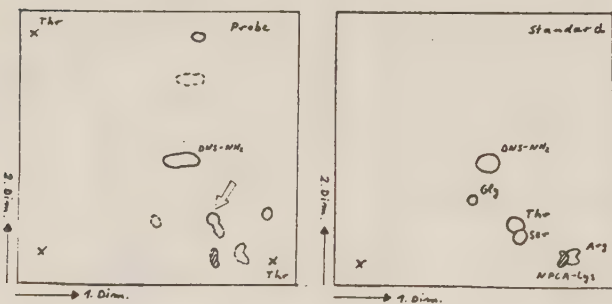


Peptid:
0-11-5-a



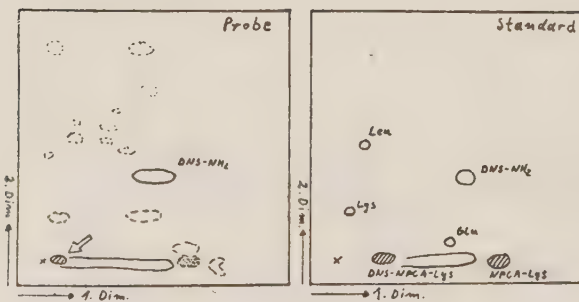
Peptid:

0-14-8



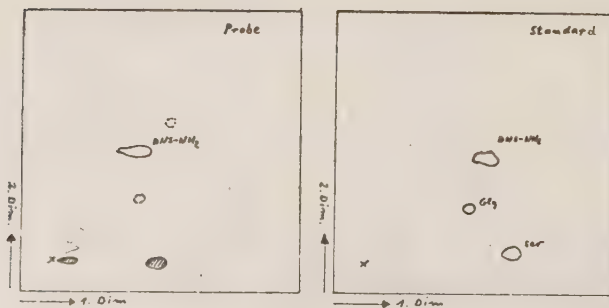
Peptid:

M-2-4-2-2



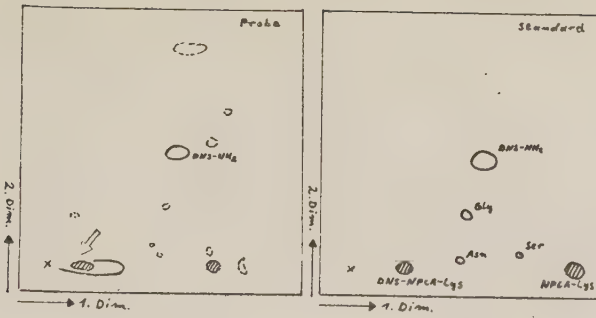
Peptid:

U-2-1



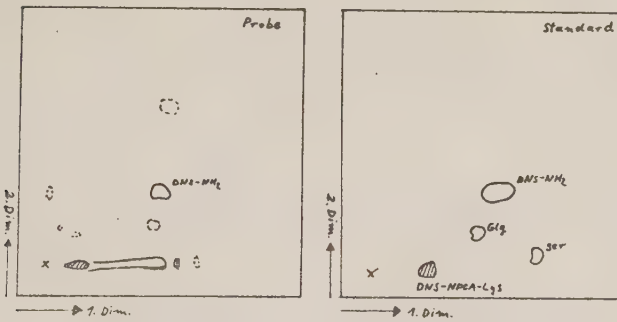
Peptid:

U-4-1-2



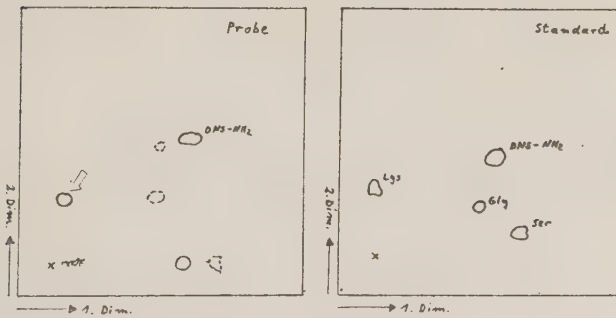
Peptid:

U-4-4



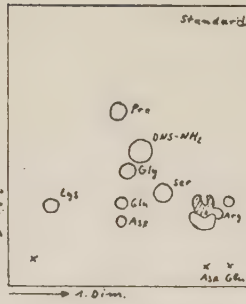
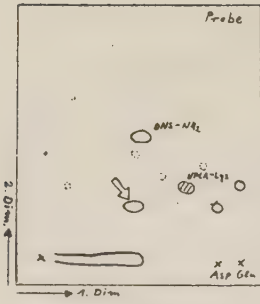
Peptid:

U-4-6

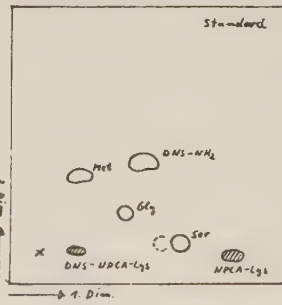
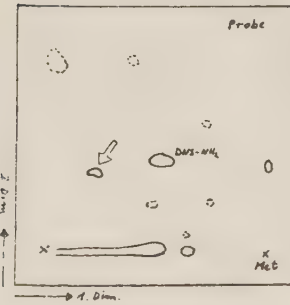


Peptid:

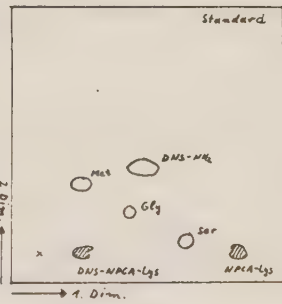
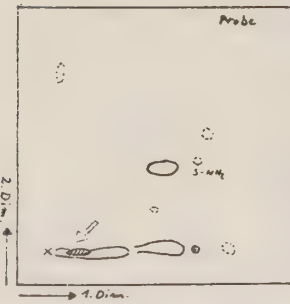
U-4-7



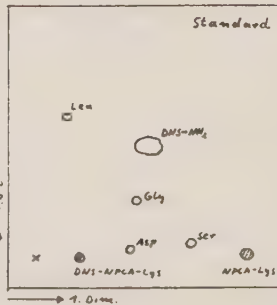
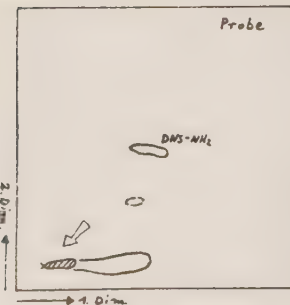
Peptid:
0-7-1



Peptid:
0-12-2



Peptid:
0-12-3-1



Peptid:
0-14-1

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geboren am 18.7.47 als Sohn des damaligen Reichsbahninspektors Kurt Kapmeyer und seiner Ehefrau Hella Kapmeyer in Hamburg.

Verheiratet seit dem 30.11.73 mit der Diplom-Chemikerin Hannelore Kapmeyer.

Schulische Ausbildung:

Im April Einschulung in die Grundschule in Hamburg.

1958-67 Besuch des Gymnasiums für Jungen in Altona.

26.1.67 Abschluß mit der Reifeprüfung.

Berufliche Ausbildung:

Ab WS 1967/68 Studium von Physiol. Chemie und Biochemie an der Universität Tübingen und Ablegung der Vordiplom-Prüfungen.

12.7.73 Abschluß der Diplomarbeit bei Professor Dr. Kirmse am Lehrstuhl für Org. Chemie und Zeugnis über die Diplom-Hauptprüfung in Chemie.

